

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-304945

(43)Date of publication of application : 31.10.2001

(51)Int.Cl.

G01G 3/16

G01G 23/01

G01N 5/02

(21)Application number : 2000-119301

(71)Applicant : NATL INST OF ADVANCED
INDUSTRIAL SCIENCE &
TECHNOLOGY METI

(22)Date of filing : 20.04.2000

(72)Inventor : KUROSAWA SHIGERU

(54) DEVICE FOR DETECTING EXTREMELY SMALL AMOUNT OF MASS USING HIGH-FREQUENCY QUARTZ RESONATOR, AND METHOD FOR CALIBRATING DETECTION DEVICE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To make accurate a device for detecting the change in a series resonance point caused by the adhesion of a small amount of mass to a quartz resonator of a weight sensor, a chemical sensor, an immunity sensor, a viscosity sensor, a coating thickness meter, or the like, and to obtain a method for calibrating the detection device accurately.

SOLUTION: By using the quartz resonator having an extremely higher fundamental frequency than a conventional one, and the harmonics of the quartz resonator, detection accuracy is improved to detect an extremely small amount of mass. At the same time, by detecting the change in the series resonance point by an impedance analyzer, the change in the resonance point to the addition of mass can be measured strictly. Also, by using the plasma polymerization method to the quartz resonator for coating a plasma polymerization film for a specific amount of time, the mass of the coated plasma polymerization film is detected, and the addition of a specific amount of mass to the quartz resonator is compared with a detection mass, the detection device can be calibrated strictly, and hence obtaining a more accurate detection device.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 20.04.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3376417

[Date of registration] 06.12.2002

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

[JP,2001-304945,A]

*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] Detection equipment of the super-minute amount mass which used the high-frequency quartz resonator characterized by measuring change of the resonance point to the mass which detected change of the series resonance point of the fundamental frequency of this quartz resonator, and the number of high order seiches using the impedance analyzer, and was added to the quartz resonator using the harmonic overtone of a quartz resonator with high fundamental frequency, and this quartz resonator.

[Claim 2] The proofreading approach of the detection equipment of super-minute amount mass of having used the high-frequency quartz resonator characterized by proofreading by detecting the mass of the plasma polymerization film covered by carrying out predetermined time covering of the plasma polymerization film to a quartz resonator, and measuring mass addition and detection mass of the specified quantity to said quartz resonator.

[Translation done.]

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. **** shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the detection equipment and its proofreading approach of the super-minute amount mass which used the high-frequency quartz resonator which enabled it to proofread correctly the detection equipment of such super-minute amount mass while being able to detect said super-minute amount mass by super-high sensitivity especially about the equipment which detects the matter mass of a super-minute amount using a high-frequency quartz resonator, and its proofreading approach.

[0002]

[Description of the Prior Art] In recent years, the quartz resonator has been used for many devices, such as a clock and a measuring instrument, as a stable oscillation component. moreover, various kinds of measurement, such as a gas sensor which employed the property as an ultramicro balance efficiently in the field of chemistry measurement, an immune sensor, a viscosity sensor, a biosensor, and a thickness gage, -- business -- *****

[0003] The Xtal flake used for a quartz resonator attaches a thin film electrode in the both sides, and has the property to return if distortion is produced according to the piezo-electric effect and it removes by applying an electrical potential difference. From this property, a quartz resonator is oscillated on the oscillation frequency of the proper decided by thickness. That is, if the matter adsorbs on the electrode of a quartz resonator, thickness will change and an oscillation frequency will change.

[0004] Although this oscillation frequency change Δf is in change and proportionality of the thickness of Xtal, if change of thickness is transposed to mass change Δm , the degree type called the formula of SABURE will be drawn.

[Equation 1]

$$\Delta f = - \frac{2 f_0^2}{\sqrt{\rho_q \mu_q}} \times \frac{\Delta m}{A}$$

f_0 (es) are the fundamental frequency of a quartz resonator, and the area of the part to which ρ_q and μ_q are carrying out the piezo-electric response of the consistency of Xtal, an elastic modulus, and the A here.

[0005] Since mass change Δm is proportional to the square of f_0 from relation with oscillation

frequency change Δf , for enlarging mass sensibility, its use of the big quartz resonator of f_0 is desirable. However, since the Xtal flake will become thin and will tend to break if the fundamental frequency f_0 of a quartz resonator is not much large, a 5-10MHz quartz resonator is usually used. In the thing of fundamental frequency, 30MHz of the conventional quartz resonator was max because of the problem on processing. Although the maximum frequency of the quartz resonator used in the solution until now is 30MHz, it has not resulted in mass measurement exceeding the limit of detection of a general-purpose quartz resonator (refer to "method of newest dissociating and refining / detecting" P441, N tea S publication, and May 26, 1997 issue).

[0006] In recent years, the environmental pollution by dioxin, environmental hormone, etc. is made into the serious social problem, and the technique which measures quantitatively the chemical of super-**** which made the mass of μg (ten to 15 μg) applicable to detection from pg (ten to 12 pg) is needed for environmental monitoring for planning environmental preservation. The oscillation frequency of the quartz resonator used for measurement is raised, and it cannot but stop thus, corresponding to high sensitivity-ization as super-high sensitivity is required.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, in the conventional thing, since it was extremely low compared with the sensibility currently asked for the mass sensibility with 1 ng/Hz , environmental monitoring by the quartz resonator, such as dioxin and environmental hormone, was theoretically difficult.

[0008] Therefore, this invention aims at offering the proofreading approach which can proofread correctly the detection equipment of such super-minute amount mass for the purpose of offering the detection equipment of the super-minute amount mass which can measure super-minute amount mass very correctly using a high-frequency quartz resonator.

[0009]

[Means for Solving the Problem] Using the harmonic overtone of a quartz resonator with high fundamental frequency, and this quartz resonator, invention which relates to claim 1 in order that this invention may solve the above-mentioned technical problem detects change of the series resonance point of the fundamental frequency of this quartz resonator, and the number of high order seiches using an impedance analyzer, and is taken as the detection equipment of the super-minute amount mass which used the high-frequency quartz resonator according to claim 1 characterized by to measure change of the resonance point to the mass added to the quartz resonator.

[0010] Moreover, invention concerning claim 2 detects the mass of the plasma polymerization film covered by the quartz resonator by carrying out predetermined time covering of the plasma polymerization film, and is taken as the proofreading approach of the detection equipment of super-minute amount mass of having used the high-frequency quartz resonator characterized by proofreading by measuring mass addition and detection mass of the specified quantity of said quartz resonator.

[0011] 50MHz (surface-mount mold: SMD) and 155MHz (surface-mount mold: SMD) per each piece [every] were used for the evaluation approach of the mass sensibility of the quartz resonator of this invention for 50MHz ($n=1$) of quartz resonators of an AT cut, an AT cut with fundamental frequency higher than the 9MHz quartz resonator of golden electrodes, and a golden electrode, 100MHz ($n=3$), and 100MHz ($n=5$) every three pieces each. Since the electrode surface of each quartz resonator may have the affix of the saved environmental origin, it performed the spatter by the helium plasma in the cleaning on

glow discharge conditions (discharge output:100W and helium pressure:100Pa) using plasma polymerization equipment, and performed surface treatment to it.

[0012] In this invention, impedance measurement equipment as shown in drawing 1 is used, using a resonance characteristic measuring device conventionally well-known for measuring change of the series resonance point of a quartz resonator. As compared with a network analyzer, a spectrum analyzer, and a tracking generator, the accuracy of measurement of an impedance analyzer is especially high, and it is the optimal model for measuring the strict resonance characteristic. The fundamental wave of each quartz resonator which performed the spatter using the impedance analyzer shown in drawing 1, Each harmonic-overtone mode of a 3 time wave, a 5 time wave, a 7 time wave, a 9 time wave, and a 11 time wave (however, a wave, 50MHz (SMD), and 155MHz (SMD) 9 times 50MHz ($n=1$)) measurement to a 3 time wave -- it is -- the series resonance point of zero phase in the impedance characteristic which can be set was measured, the value of each component in the equal circuit of a quartz resonator was computed from the value acquired by resonance characteristic measurement, simulation of a phase and the resonance point was performed, and the wave was printed by the printer. The value of each component of an equal circuit was inputted into the personal computer, and analysis about the electrical equivalent circuit of a quartz resonator was performed. It considered as the radix point of change of the resonance characteristic by future measurement, having used as plasma polymerization 0 minute measured value of the quartz resonator which performed surface treatment by this plasma spatter.

[0013] Styrene film attachment for 1 minute was performed to these quartz resonators on conditions (100W and 100Pa) after the impedance measurement termination after a plasma spatter, and change of the series resonance point for every overtone of each quartz resonator to styrene film weight was measured using the impedance analyzer (till 5 minutes, film attachment for every 5 minutes was performed about every minute and it or below, and film attachment of a total of 120 minutes was performed). If a plasma polymerization is carried out, especially the raw material monomer made to adhere on Xtal is not restricted to styrene, but a polymerization film formation rate is fixed and proportional to plasma polymerization time amount, it is also possible to use what kind of raw material. For example, use of methane, ethane, ethylene, acetylene, tetrachloroethylene, a propylene, allyl alcohol, allylamine, an acrolein, methacrolein, an acrylic acid, pen TAFURUO styrene, etc. is possible. What is necessary is not to restrict plasma polymerization conditions to 100W and especially 100Pa, either, and just to use the polymerization conditions suitable for a raw material monomer.

[0014]

[Example] Next, an example explains this invention to a detail further. In addition, these examples are for understanding this invention, and do not limit this invention at all.

[0015] Film attachment of 0 - 120 minutes was performed to the quartz resonator of 150MHz of examples ($n=1$), and resonance point change to each polymerization time amount (50MHz (fundamental wave), 150MHz (3 time wave), and 250MHz (5 time wave)) was measured. The result of frequency change of as opposed to film weight for the result of the frequency change to polymerization time amount is shown in drawing 3 at drawing 2. The mass sensibility in each mode was computed from the inverse number of the inclination in the proportional part of the frequency change to film weight by the fundamental wave of drawing 3, the 3 time wave, and the 5 time wave, and it was shown in Table 1. Mass sensibility is similarly computed in the following examples of an experiment. As shown also in Table 1, in fundamental-wave mode, it turns out 5.144 pg/Hz and that it has the mass sensibility of 0.755 pg/Hz in

wave mode 0.893 pg/Hz and 5 times in wave mode 3 times.

[0016] Change of the resonance point to film polymerization time amount (33MHz (fundamental wave), 100-/Hz (3 time wave), and 167MHz (5 time wave)) was measured like the example 1 except having changed the 50MHz (n= 1) quartz resonator into the 100MHz (n= 3) quartz resonator in example 2 example 1. The result of frequency change of as opposed to film weight for the result of the frequency change to polymerization time amount is shown in drawing 5 at drawing 4 . As shown also in Table 1, in fundamental-wave mode, it turns out 19.538pgMHz(es) and that it has the mass sensibility of 2.053 pg/Hz in wave mode 4.209 pg/Hz and 5 times in wave mode 3 times.

[0017] Change of the resonance point to film polymerization time amount (20MHz (fundamental wave), 60MHz (3 time wave), and 100MHz (5 time wave)) was measured like the example 1 except having changed the 50MHz (n= 1) quartz resonator into the 100MHz (n= 5) quartz resonator in example 3 example 1. The result of frequency change of as opposed to film weight for the result of the frequency change to polymerization time amount is shown in drawing 7 at drawing 6 . As shown also in Table 1, in fundamental-wave mode, it turns out 78.152 pg/Hz and that it has the mass sensibility of 9.674 pg/Hz in wave mode 17.744 pg/Hz and 5 times in wave mode 3 times.

[0018] In example 4 example 1, the 50MHz (n= 1) quartz resonator was changed into the 50MHz (surface-mount mold component: SMD) quartz resonator, film attachment of 0 - 45 minutes was performed, and change of the resonance point to film polymerization time amount (50MHz (fundamental wave) and 150MHz (3 time wave)) was measured. The result of frequency change of as opposed to film weight for the result of the frequency change to polymerization time amount is shown in drawing 9 at drawing 8 . As shown also in Table 1, in fundamental-wave mode, it turns out 7.050 pg/Hz and that it has the mass sensibility of 1.035 pg/Hz in wave mode 3 times.

[0019] In example 5 example 1, the 50MHz (n= 1) quartz resonator was changed into the 155MHz (SMD) quartz resonator, film attachment of 0 - 30 minutes was performed, and change of the resonance point to film polymerization time amount (155MHz (fundamental wave) and 465MHz (3 time wave)) was measured. The result of frequency change of as opposed to film weight for the result of the frequency change about polymerization time amount is shown in drawing 11 at drawing 10 . It is clear to have the mass sensibility of 0.004 pg/Hz in wave mode 0.036 pg/Hz and 3 times in fundamental-wave mode, as shown in Table 1.

[0020]

[Effect of the Invention] Invention concerning claim 1 of this application can improve the sensitometry and precision of super-minute amount mass by leaps and bounds by using the harmonic overtone of the quartz resonator which has remarkable high fundamental frequency compared with the conventional vibrator, and this quartz resonator. Moreover, the resonance point change to mass addition of the above mentioned can be strictly measured by detecting change of a series resonance point using an impedance analyzer. Moreover, invention concerning claim 2 can proofread such detection equipment correctly and easily.

[0021] Thus, as a result of it came being able to perform highly precise measurement of the super-minute amount weight which adhered on the quartz resonator, and proofreading, conventionally, the quartz resonator which has measured only the mass of ng (ten to 9 g) can measure now correctly the mass of a super-minute amount of fg (ten to 15 g) from pg (ten to 12 g), and simple sensing of the environmental hormone by the quartz resonator made conventionally difficult or dioxin of this invention becomes

possible.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is a block diagram at the time of measuring change of the series resonance point of ** with impedance measurement equipment in this invention.

[Drawing 2] In this invention, it is the graph which shows the frequency change to the polymerization time amount of the plasma polymerization styrene film of a 50MHz (n= 1) quartz resonator.

[Drawing 3] It is the graph which shows the frequency change to the plasma polymerization styrene film weight of the 50MHz (n= 1) quartz resonator of ****.

[Drawing 4] It is the graph which shows the frequency change to the polymerization time amount of the plasma polymerization styrene film of the 100MHz (n= 3) quartz resonator of ****.

[Drawing 5] It is the graph which shows the frequency change to the plasma polymerization styrene film weight of the 100MHz (n= 3) quartz resonator of ****.

[Drawing 6] It is the graph which shows the frequency change to the polymerization time amount of the plasma polymerization styrene film of the 100MHz (n= 5) quartz resonator of ****.

[Drawing 7] It is the graph which shows the frequency change to the plasma polymerization styrene film weight of the 100MHz (n= 5) quartz resonator of ****.

[Drawing 8] It is the graph which shows the frequency change to the polymerization time amount of the plasma polymerization styrene film of the 50MHz (SMD) quartz resonator of ****.

[Drawing 9] It is the graph which shows the frequency change to the plasma polymerization styrene film weight of the 50MHz (SMD) quartz resonator of ****.

[Drawing 10] It is the graph which shows the frequency change to the polymerization time amount of the plasma polymerization styrene film of the 155MHz (SMD) quartz resonator of ****.

[Drawing 11] It is the graph which shows the frequency change to the plasma polymerization styrene film weight of the 155MHz (SMD) quartz resonator of ****.

[Table 1]

水晶振動子の質量感度の測定値

水晶振動子	モード	実測値 (pg/Hz)
9MHz	9MHz (n=1)	1072.000
50MHz	50MHz (n=1)	5.114
	150MHz (n=3)	0.893
	250MHz (n=5)	0.775
	350MHz (n=7)	0.680
	450MHz (n=9)	0.653
100(3)MHz	33MHz (n=1)	19.538
	100MHz (n=3)	4.209
	167MHz (n=5)	2.053
	233MHz (n=7)	1.929
	300MHz (n=9)	2.386
	367MHz (n=11)	1.858
100(5)MHz	20MHz (n=1)	78.156
	60MHz (n=3)	17.744
	100MHz (n=5)	9.674
	140MHz (n=7)	12.139
	180MHz (n=9)	9.476
	220MHz (n=11)	7.851
50MHz	50MHz (n=1)	7.050
(SMD Type)	150MHz (n=3)	1.035
155MHz	155MHz (n=1)	0.036
(SMD Type)	465MHz (n=3)	0.004

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-304945

(P2001-304945A)

(43) 公開日 平成13年10月31日 (2001. 10. 31)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

ターマート* (参考)

G 0 1 G 3/16

G 0 1 G 3/16

23/01

23/01

Z

G 0 1 N 5/02

G 0 1 N 5/02

A

審査請求 有 請求項の数 2 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願2000-119301(P2000-119301)

(22) 出願日 平成12年4月20日 (2000. 4. 20)

(71) 出願人 301000011

経済産業省産業技術総合研究所長

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(72) 発明者 黒澤 茂

茨城県つくば市東1丁目1番 工業技術院

物質工学工業技術研究所内

(54) 【発明の名称】 高周波数水晶振動子を用いた超微量質量の検出装置及びその校正方法

(57) 【要約】

【目的】 重さセンサー、化学センサー、免疫センサー、粘度センサーや膜厚計などの、水晶振動子への微量質量付着による直列共振点の変化を検出する装置を高精度とし、また、その検出装置を高精度で校正できる校正方法を得る。

【構成】 従来の振動子に比べて、著しく高い基本周波数を持つ水晶振動子及び同水晶振動子の倍音を用いることにより検出精度が向上し、超微量質量を検出することができると共に、これをインピーダンスアナライザを用いて直列共振点の変化を検出することにより、前記のようなものの質量付加に対する共振点変化を厳密に測定することができる。また、水晶振動子にプラズマ重合法を用いてプラズマ重合膜を所定時間被覆し、被覆されたプラズマ重合膜の質量を検出して、水晶振動子への所定量の質量付加と検出質量とを比較することによりその検出装置の厳密な校正を行う。それにより、より高精度の検出装置が得られる。

(2)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 高い基本周波数をもつ水晶振動子及び同水晶振動子の倍音を用い、同水晶振動子の基本振動数、及び高次副振動数の直列共振点の変化をインピーダンスアナライザを用いて検出し、水晶振動子に付加した質量に対する共振点の変化を測定することを特徴とする高周波数水晶振動子を用いた超微量質量の検出装置。

【請求項2】 水晶振動子にプラズマ重合膜を所定時間被覆し、被覆されたプラズマ重合膜の質量を検出して、前記水晶振動子への所定量の質量付加と検出質量とを比較することにより校正を行うことを特徴とする高周波数水晶振動子を用いた超微量質量の検出装置の校正方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、超微量の物質質量を高周波数水晶振動子を用いて検出する装置、及びその校正方法に関し、特に前記超微量質量を超高感度で検出することができると共に、このような超微量質量の検出装置を正確に校正することができるようにした高周波数水晶振動子を用いた超微量質量の検出装置、及びその校正方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、水晶振動子は安定な発振素子として時計、計測器など多くの機器に使用されてきた。また、化学計測の分野においては、超微量天秤としての特性を生かしたガスセンサー、免疫センサー、粘度センサー、バイオセンサー、膜厚計等の各種の計測に用いられている。

【0003】水晶振動子に用いられる水晶薄片はその両面に薄膜電極を取り付け、電圧を加えることによって圧電効果により歪みを生じ、取り除くと元に戻るという性質をもっている。この性質から、水晶振動子は厚さで決まる固有の発振周波数で発振する。即ち、水晶振動子の電極上に物質が吸着すると、厚さが変わり発振周波数が変化する。

【0004】この発振周波数変化 Δf は水晶の厚さの変化と比例関係にあるが、厚さの変化を質量変化 Δm に置き換えるとサンプレの式と呼ばれる次式が導かれる。

【数1】

$$\Delta f = - \frac{2 f_0^2}{\sqrt{\rho_q \mu_q}} \times \frac{\Delta m}{A}$$

ここで f_0 は水晶振動子の基本周波数、 ρ_q と μ_q は水晶の密度と弾性率、 A は圧電応答している部分の面積である。

【0005】質量変化 Δm は、発振周波数変化 Δf との関係から f_0 の2乗に比例するから、質量感度を大きくするには f_0 の大きな水晶振動子の使用が望ましい。しかし、水晶振動子の基本周波数 f_0 があまり大きいと水

2

晶薄片が薄くなり壊れやすいため、通常は5～10MHzの水晶振動子が用いられる。従来の水晶振動子は加工上の問題のため基本周波数のものでは30MHzが最大であった。これまで溶液中で用いられた水晶振動子の最大周波数は30MHzであるが、汎用水晶振動子の検出限界を超える質量測定には至っていない（「最新の分離・精製・検出法」P441、エヌ・ディー・エス出版、1997年5月26日発行参照）。

【0006】近年、ダイオキシン類や環境ホルモン等による環境汚染が深刻な社会問題とされており、環境保全を図るための環境モニタリング用には、pg（ 10^{-12} g）からfg（ 10^{-15} g）の質量を検出対象とした超微量の化学物質を定量的に測定する技術が必要とされている。このように超高感度を要求されるに従い、測定に使用する水晶振動子の発振周波数を上げて高感度化に対応せざるを得なくなっている。

【0007】

【本発明が解決しようとする課題】しかしながら従来のものにおいてはその質量感度は1ng/Hzと、求められている感度に比べて極端に低いため、水晶振動子によるダイオキシン類や環境ホルモン類等の環境モニタリングは原理的に困難であった。

【0008】したがって、本発明は、高周波数水晶振動子を用いて超微量質量を極めて正確に測定することができる超微量質量の検出装置を提供することを目的とし、またそのような超微量質量の検出装置を正確に校正することができる校正方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は上記課題を解決するため、請求項1に係る発明は、高い基本周波数をもつ水晶振動子及び同水晶振動子の倍音を用い、同水晶振動子の基本振動数、及び高次副振動数の直列共振点の変化をインピーダンスアナライザを用いて検出し、水晶振動子に付加した質量に対する共振点の変化を測定することを特徴とする請求項1記載の高周波数水晶振動子を用いた超微量質量の検出装置としたものである。

【0010】また、請求項2に係る発明は、水晶振動子にプラズマ重合膜を所定時間被覆し、被覆されたプラズマ重合膜の質量を検出して、前記水晶振動子の所定量の質量付加と検出質量とを比較することにより校正を行うことを特徴とする高周波数水晶振動子を用いた超微量質量の検出装置の校正方法としたものである。

【0011】本発明の水晶振動子の質量感度の評価方法には、ATカット、金電極9MHz水晶振動子より基本周波数の高いATカット、金電極の水晶振動子50MHz（ $n=1$ ）、100MHz（ $n=3$ ）、100MHz（ $n=5$ ）を各3個ずつ、50MHz（表面実装型：SMD）、155MHz（表面実装型：SMD）を各1個ずつ使用した。各水晶振動子の電極表面は保存している環境由来の付着物がある場合があるためそのクリーニングには、プラズマ重合装置を

(3)

3

用いて放電出力：100W、ヘリウム圧力：100Paのグロー放電条件でヘリウムプラズマによるスパッタを行い表面処理を施した。

【0012】本発明において、水晶振動子の直列共振点の変化を測定するには従来公知の共振特性測定装置を用い、例えば図1に示されるようなインピーダンス測定装置を使用する。特にインピーダンスアナライザはネットワークアナライザ、スペクトラムアナライザ、トラッキングジェネレータに比較してその測定精度が高く、厳密な共振特性を測定するには最適な機種である。図1に示すインピーダンスアナライザを用いてスパッタを行った各水晶振動子の基本波、3倍波、5倍波、7倍波、9倍波、11倍波の各倍音モード（但し、50MHz (n=1) は9倍波、50MHz (SMD)、155MHz (SMD) は、3倍波までの測定である）におけるインピーダンス特性での位相0度の直列共振点を測定し、共振特性測定によって得られた値から水晶振動子の等価回路における各素子の値を算出し、位相、共振点のシミュレーションを行ない、その波形をプリンタで印刷した。等価回路の各素子の値をパーソナルコンピュータに入力して水晶振動子の電気的等価回路についての解析を行った。このプラズマスパッタによる表面処理を行った水晶振動子の測定値をプラズマ重合0分として、以後の測定による共振特性の変化の基点とした。

【0013】プラズマスパッタ後のインピーダンス測定終了後、これらの水晶振動子に100W、100Paの条件で1分間のスチレン膜付けを行ない、インピーダンスアナライザを用いてスチレン膜重量に対する各水晶振動子のオーバートーン毎の直列共振点の変化の測定を行った（5分までは1分毎、それ以降については5分毎の膜付けを行い合計120分の膜付けを行った）。プラズマ重合して、水晶上に付着させる原料モノマーはスチレンに特に制限されず、プラズマ重合時間に対して重合膜形成速度が一定で比例していればどのような原料を用いることも可能である。例えば、メタン、エタン、エチレン、アセチレン、テトラクロロエチレン、プロピレン、アリルアルコール、アリルアミン、アクロレイン、メタクロレイン、アクリル酸、ペンタフルオロスチレン等の利用が可能である。プラズマ重合条件も、特に100W、100Paに制限されるものではなく、原料モノマーに適した重合条件を用いればよい。

【0014】

【実施例】次に、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。なお、これらの実施例は本発明を理解するためのものであり、本発明を何ら限定するものではない。

【0015】実施例1

50MHz (n=1) の水晶振動子に対して0～120分の膜付けを行い、50MHz（基本波）、150MHz（3倍波）、250MHz（5倍波）の各重合時間に対する共振点変化の測定を行なった。図2には重合時間に対する周

4

波数変化の結果を、図3には膜重量に対する周波数変化の結果を示す。図3の基本波、3倍波、5倍波で膜重量に対する周波数変化の比例部分での勾配の逆数より、各モードでの質量感度を算出し表1に示した。以下の実験例でも同様に質量感度を算出している。表1にもあるように基本波モードでは5.144pg/Hz、3倍波モードでは0.893pg/Hz、5倍波モードでは0.755pg/Hzの質量感度を持つことがわかる。

【0016】実施例2

10 実施例1において50MHz (n=1) の水晶振動子を100MHz (n=3) の水晶振動子に変えた以外は実施例1と同様にして33MHz（基本波）、100/Hz（3倍波）、167MHz（5倍波）の膜重合時間に対する共振点の変化の測定を行なった。図4には重合時間に対する周波数変化の結果を、図5には膜重量に対する周波数変化の結果を示す。表1にもあるように基本波モードでは19.538pg/MHz、3倍波モードでは4.209pg/Hz、5倍波モードでは2.053pg/Hzの質量感度を持つことがわかる。

20 【0017】実施例3

実施例1において50MHz (n=1) の水晶振動子を100MHz (n=5) の水晶振動子に変えた以外は実施例1と同様にして20MHz（基本波）、60MHz（3倍波）、100MHz（5倍波）の膜重合時間に対する共振点の変化の測定を行なった。図6には重合時間に対する周波数変化の結果を、図7には膜重量に対する周波数変化の結果を示す。表1にもあるように基本波モードでは78.152pg/Hz、3倍波モードでは17.744pg/Hz、5倍波モードでは9.674pg/Hzの質量感度を持つことがわかる。

30 【0018】実施例4

実施例1において50MHz (n=1) の水晶振動子を50MHz（表面実装型素子：SMD）の水晶振動子に変え、0～45分の膜付けを行い、50MHz（基本波）、150MHz（3倍波）の膜重合時間に対する共振点の変化の測定を行なった。図8には重合時間に対する周波数変化の結果を、図9には膜重量に対する周波数変化の結果を示す。表1にもあるように基本波モードでは7.050pg/Hz、3倍波モードでは1.035pg/Hzの質量感度を持つことがわかる。

40 【0019】実施例5

実施例1において50MHz (n=1) の水晶振動子を155MHz (SMD) の水晶振動子に変え0～30分の膜付けを行い、155MHz（基本波）、465MHz（3倍波）の膜重合時間に対する共振点の変化の測定を行なった。図10には重合時間に関する周波数変化の結果を、図11には膜重量に対する周波数変化の結果を示す。表1に示すように基本波モードでは0.036pg/Hz、3倍波モードでは0.004pg/Hzの質量感度を持つことが明らかである。

50

(4)

5

【0020】

【発明の効果】本願の請求項1に係る発明は、従来の振動子に比べて著しく高い基本周波数をもつ水晶振動子及び同水晶振動子の倍音を用いることにより、超微量質量の測定感度及び精度を飛躍的に向上することができる。また、インピーダンスアナライザを用いて直列共振点の変化を検出することにより、前記のようなものの質量付加に対する共振点変化を厳密に測定することができる。また、請求項2に係る発明は、そのような検出装置を正確に、且つ容易に校正することができる。

【0021】このように、本発明は水晶振動子上に付着した超微量重量の高精度の測定、及び校正ができるようになった結果、従来は ng (10^{-9}g) の質量しか測定できなかった水晶振動子が、 pg (10^{-12}g) から fg (10^{-15}g) の超微量の質量を正確に測定できるようになり、従来困難とされていた、水晶振動子による環境ホルモンやダイオキシン類の簡易センシングが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明において、の直列共振点の変化をインピーダンス測定装置により測定する際のブロック図である

【図2】本発明において、50MHz ($n=1$) 水晶振動子のプラズマ重合スチレン膜の重合時間に対する周波数変化を示すグラフである。

【図3】同、50MHz ($n=1$) 水晶振動子のプラズマ重合スチレン膜重量に対する周波数変化を示すグラフである。

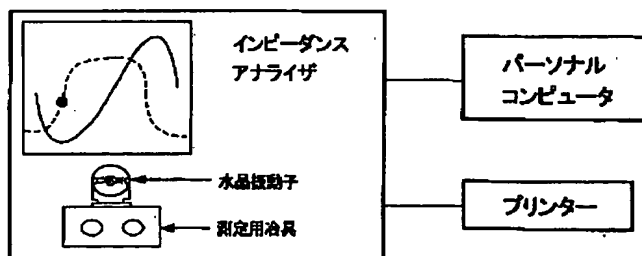
【図4】同、100MHz ($n=3$) 水晶振動子のプラズマ重合スチレン膜の重合時間に対する周波数変化を示すグラフである。

【図5】同、100MHz ($n=3$) 水晶振動子のプラズマ重合スチレン膜重量に対する周波数変化を示すグラフである。

【図6】同、100MHz ($n=5$) 水晶振動子のプラズマ重合スチレン膜の重合時間に対する周波数変化を示すグラフである。

【図7】同、100MHz ($n=5$) 水晶振動子のプラズマ重合スチレン膜重量に対する周波数変化を示すグラフである。

【図1】



実線：インピーダンス曲線 *位相曲線が0° (●点)と共振曲線
破線：位相曲線 線が交差する点を検出・測定する

6

ある。

【図8】同、50MHz (SMD) 水晶振動子のプラズマ重合スチレン膜の重合時間に対する周波数変化を示すグラフである。

【図9】同、50MHz (SMD) 水晶振動子のプラズマ重合スチレン膜重量に対する周波数変化を示すグラフである。

【図10】同、155MHz (SMD) 水晶振動子のプラズマ重合スチレン膜の重合時間に対する周波数変化を示すグラフである。

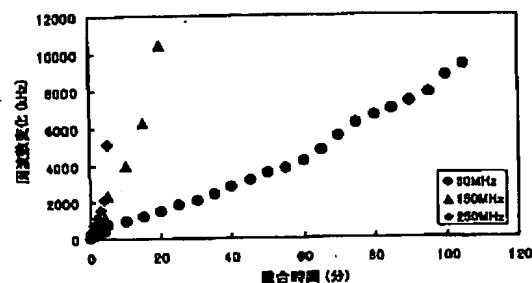
【図11】同、155MHz (SMD) 水晶振動子のプラズマ重合スチレン膜重量に対する周波数変化を示すグラフである。

【表1】

水晶振動子の質量感度の測定値

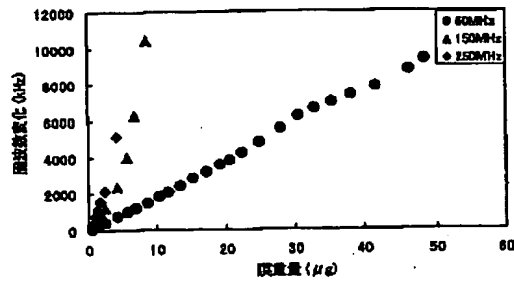
水晶振動子	モード	実測値 (pg/Hz)
9MHz	9MHz ($n=1$)	1072.000
50MHz	50MHz ($n=1$)	5.114
	150MHz ($n=3$)	0.893
	250MHz ($n=5$)	0.775
	350MHz ($n=7$)	0.690
	450MHz ($n=9$)	0.653
100(3)MHz	33MHz ($n=1$)	19.538
	100MHz ($n=3$)	4.209
	167MHz ($n=5$)	2.053
	233MHz ($n=7$)	1.828
	300MHz ($n=9$)	2.388
	367MHz ($n=11$)	1.858
100(5)MHz	20MHz ($n=1$)	78.156
	60MHz ($n=3$)	17.744
	100MHz ($n=5$)	9.674
	140MHz ($n=7$)	12.139
	180MHz ($n=9$)	9.478
	220MHz ($n=11$)	7.851
50MHz (SMD Type)	50MHz ($n=1$)	7.050
	150MHz ($n=3$)	1.035
155MHz (SMD Type)	155MHz ($n=1$)	0.038
	465MHz ($n=3$)	0.004

【図2】

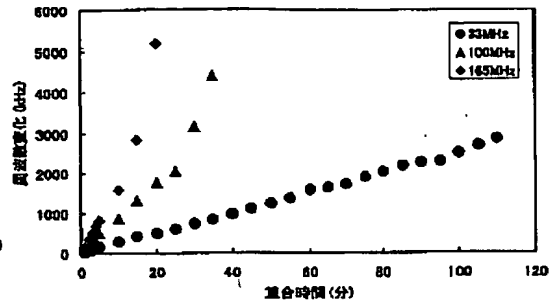


(5)

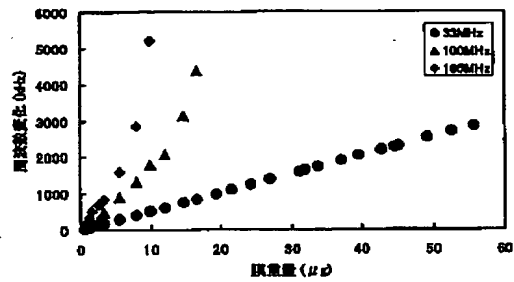
【図3】



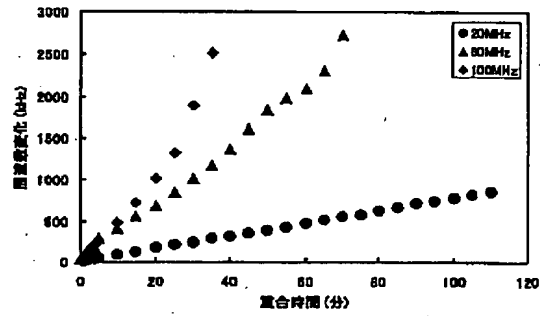
【図4】



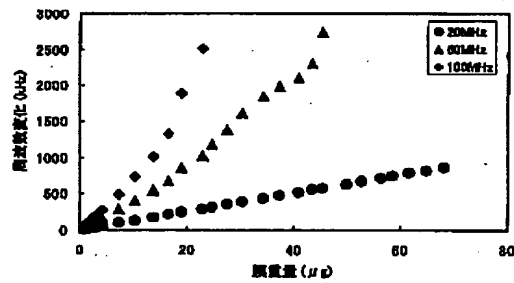
【図5】



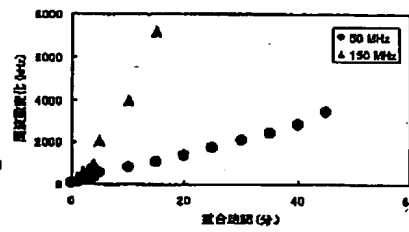
【図6】



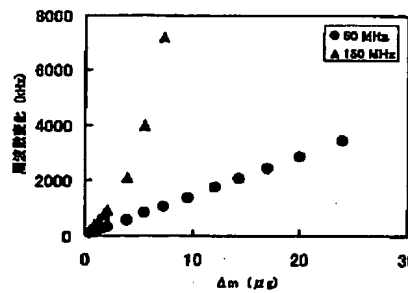
【図7】



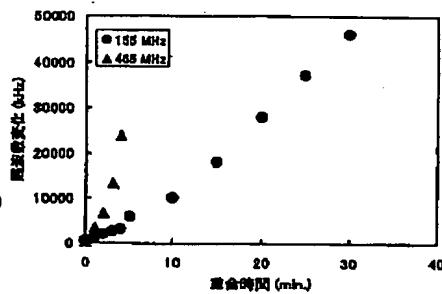
【図8】



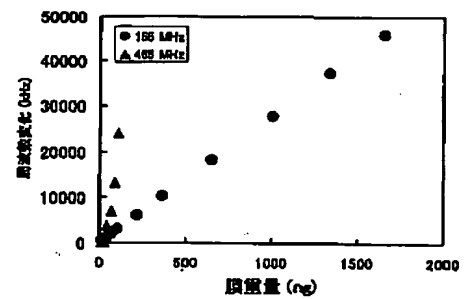
【図9】



【図10】



【図11】



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-043284

(43)Date of publication of application : 14.02.1995

(51)Int.Cl.

G01N 5/02

C12Q 1/00

C12Q 1/58

G01N 33/62

(21)Application number : 05-190584

(71)Applicant : OKI ELECTRIC IND CO LTD

(22)Date of filing : 30.07.1993

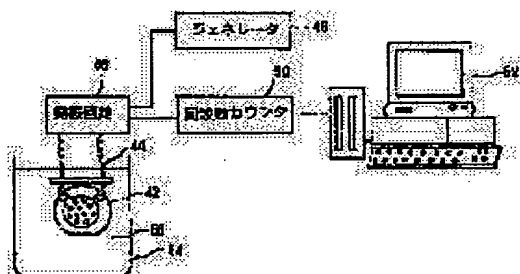
(72)Inventor : SAITO MINORU
UMIBE KATSUAKI
KATO MASAKAZU
MIYAMOTO HIROO

(54) DETERMINATION OF QUANTITY OF CHEMICAL SUBSTANCE, ENZYME SENSOR THEREFOR AND PRODUCTION THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a method for determining the quantity of chemical substance in a short time, an enzyme sensor being employed therein, and production thereof.

CONSTITUTION: A crystal oscillator fixed with the urease of a urine sensor 42 has a terminal 44 connected with an oscillation circuit 46. The oscillation circuit 46 is connected with a generator(power supply) 48. The oscillation circuit 46 has an output terminal connected with a frequency counter 50 which is connected with a computer 52. The urine sensor 42 is immersed into phosphoric acid butter 56 of pH 7.2 filled in a beaker 54.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The quantum approach of the amount of chemicals characterized by carrying out the quantum of the amount of chemicals by fixing an enzyme to a quartz resonator and comparing with the oscillation frequency of said quartz resonator when this amount of chemicals has not adhered the oscillation frequency at the time of making this amount of chemicals adhere to the front face of said quartz resonator by the enzyme reaction into which this enzyme decomposes the specific amount of chemicals, respectively.

[Claim 2] The oscillation frequency at the time of making this amount of chemicals adhere to the front face of said surface acoustic wave device by the enzyme reaction into which an enzyme is fixed to a surface acoustic wave device, and this enzyme decomposes the specific amount of chemicals, [whether the oscillation frequency of said surface acoustic wave device when this amount of chemicals has not adhered is compared, and] Or the quantum approach of the amount of chemicals characterized by carrying out the quantum of the amount of chemicals by comparing resonance frequency when this amount of chemicals makes it adhere to the front face of said surface acoustic wave device with the resonance frequency of said surface acoustic wave device when this amount of chemicals has not adhered.

[Claim 3] The quantum approach of the amount of chemicals which is characterized by using the covalent bond of said enzyme and glutaraldehyde in the quantum approach of the amount of chemicals according to claim 1 or 2 in fixing said enzyme to said quartz resonator or said surface acoustic wave device.

[Claim 4] The quantum approach of the amount of chemicals which is characterized by using the specific binding reaction of avidin and a biotin in the quantum approach of the amount of chemicals according to claim 1 or 2 in fixing said enzyme to said quartz resonator or said surface acoustic wave device.

[Claim 5] The quantum approach of the amount of chemicals which is characterized by using the specific binding reaction of streptoavidin and a biotin in the quantum approach of the amount of chemicals according to claim 1 or 2 in fixing said enzyme to said quartz resonator or said surface acoustic wave device.

[Claim 6] The quantum approach of the amount of chemicals characterized by making said enzyme into an urease and carrying out the quantum of the amount of ureas in the quantum approach of the amount of chemicals according to claim 1 or 2.

[Claim 7] The enzyme sensor characterized by coming to fix an enzyme to a quartz resonator.

[Claim 8] The enzyme sensor characterized by coming to fix an enzyme to a surface acoustic wave device.

[Claim 9] The enzyme sensor characterized by performing immobilization with said enzyme and said

quartz resonator, or said surface acoustic wave device using the covalent bond of said enzyme and glutaraldehyde in an enzyme sensor according to claim 7 or 8.

[Claim 10] The enzyme sensor characterized by performing immobilization with said enzyme and said quartz resonator, or said surface acoustic wave device using the specific binding reaction of avidin and a biotin in an enzyme sensor according to claim 7 or 8.

[Claim 11] The enzyme sensor characterized by using the specific binding reaction of streptoavidin and a biotin for immobilization with said enzyme and said quartz resonator, or said surface acoustic wave device in an enzyme sensor according to claim 7 or 8.

[Claim 12] The enzyme sensor characterized by making said enzyme into an urease in an enzyme sensor according to claim 7 or 8.

[Claim 13] The manufacture approach of the enzyme sensor which is characterized by performing immobilization with said enzyme and said quartz resonator, or said surface acoustic wave device using the covalent bond of said enzyme and glutaraldehyde in manufacturing an enzyme sensor according to claim 7 or 8.

[Claim 14] The manufacture approach of the enzyme sensor which is characterized by performing immobilization with said enzyme and said quartz resonator, or said surface acoustic wave device using the specific binding reaction of avidin and a biotin in manufacturing an enzyme sensor according to claim 7 or 8.

[Claim 15] The manufacture approach of the enzyme sensor which is characterized by performing immobilization with said enzyme and said quartz resonator, or said surface acoustic wave device using the specific binding reaction of streptoavidin and a biotin in manufacturing an enzyme sensor according to claim 7 or 8.

[Claim 16] The manufacture approach of the enzyme sensor characterized by making said enzyme into an urease in the manufacture approach of an enzyme sensor according to claim 13, 14, or 15.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. **** shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the enzyme sensor which uses the quantum approach of the amount of chemicals, and this, and its manufacture approach.

[0002]

[Description of the Prior Art] In recent years, in the medical field, the chemical sensor which carries out the quantum of the organic substance alternatively is demanded. For example, in a clinical laboratory test, the quantitative analysis of a patient's **** and the urea in body fluid is important, when diagnosing a kidney function. Moreover, in case artificial dialysis is given to the patient of chronic renal failure, also when giving the count of artificial dialysis, and the standard of dialysis time amount and performing planned artificial dialysis, the quantitative analysis of a urea is indispensable.

[0003] Until now, according to reference 1: "the volume biosensors and for Shuichi Suzuki and Kodansha scientific ** (1984)", the attempt using the molecular recognition function which excelled [function part / of a chemical sensor / recognition] in the enzyme is made, for example. The enzyme sensor which changes and carries out the quantum of the matter fluctuated when an enzyme recognizes the specific amount of chemicals (it is also hereafter called a substrate) and carries out the catalyst of the specific reaction to the amount of chemicals to an electrical signal with an oxygen electrode, a hydrogen peroxide electrode, a hydrogen electrode, an ammonia electrode, the carbon dioxide electrode, an ion-selective FET electrode, etc. is proposed.

[0004] As an example of the conventional enzyme sensor, an urea sensor is briefly explained with reference to a drawing. Drawing 9 is a sectional view with which explanation of the conventional urea sensor is presented. This urea sensor is NH_4^+ which carried out decomposition generation from the urea by the urease 28 fixed to the porous glass film 12. The quantum is changed and carried out to the electrical signal with the silver-silver chloride electrode 24 through the ammonia permselective membrane 26.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, for example, in the urea sensor mentioned above, it was the structure which reaches an electrode (silver-silver chloride electrode) first after spreading a substrate (in this case, urea) in the enzyme fixed film and diffusing the film (ammonia permselective membrane) with which the product (NH_4^+) by the enzyme reaction of a there penetrates that product alternatively further. For this reason, there was a fault of requiring time amount until the electrical

signal outputted from an urea sensor became constant value, after starting measurement.

[0006] For this reason, the artifice concerning this application noted that the oscillation frequency of a quartz resonator, the oscillation frequency of a surface acoustic wave device, or resonance frequency decreased in proportion to the mass of the matter adhering to these quartz resonators or a surface acoustic wave device, as a result of repeating various examination. (A quartz resonator and a surface acoustic wave device are hereafter called vibrator collectively.) Moreover, an oscillation frequency and resonance frequency are collectively called vibration frequency. Such a phenomenon is indicated by reference I: "living thing physics, vol.28, No.6 (1988)." According to the reference I, it is shown by using a bimolecular membrane covering quartz resonator that sensing of the smell matter and the bitterness matter is possible.

[0007] Then, this artifice found out the approach of carrying out the quantum of the amount of a substrate, without passing through a diffusion process by fixing an enzyme to vibrator and detecting change of the vibration frequency of this vibrator, as a result of repeating various experiments and examination further.

[0008] The 1st purpose which this invention is made in view of such a point, therefore starts this application is to offer the quantum approach of the amount of chemicals which can carry out the quantum of the amount of the amount of chemicals in a short time. Moreover, the 2nd purpose concerning this application is to offer the enzyme sensor used for the quantum approach of the amount of chemicals of the 1st purpose. Moreover, the 3rd purpose of this invention is to offer the manufacture approach of the enzyme sensor of the 2nd purpose.

[0009]

[Means for Solving the Problem] In order to aim at achievement of this purpose, according to the quantum approach of the amount of chemicals this invention, it is characterized by carrying out the quantum of the amount of chemicals by fixing an enzyme to a quartz resonator and comparing with the oscillation frequency of a quartz resonator when the amount of chemicals has not adhered the oscillation frequency at the time of making the amount of chemicals adhere on the surface of a quartz resonator by the enzyme reaction into which this enzyme decomposes the specific amount of chemicals, respectively.

[0010] Moreover, the oscillation frequency at the time of making the amount of chemicals adhere on the surface of a surface acoustic wave device by the enzyme reaction into which an enzyme is fixed to a surface acoustic wave device, and this enzyme decomposes the specific amount of chemicals according to the quantum approach of the amount of chemicals this invention, [whether the oscillation frequency of a surface acoustic wave device when the amount of chemicals has not adhered is compared, and] Or it is characterized by carrying out the quantum of the amount of chemicals by comparing resonance frequency when the amount of chemicals makes it adhere to the front face of said surface acoustic wave device with the resonance frequency of a surface acoustic wave device when the amount of chemicals has not adhered.

[0011] Moreover, in fixing an enzyme to a quartz resonator or a surface acoustic wave device in enforcing the quantum approach of the amount of chemicals this invention, it is desirable to use the covalent bond of an enzyme and glutaraldehyde.

[0012] Moreover, in fixing an enzyme to a quartz resonator or a surface acoustic wave device in enforcing the quantum approach of the amount of chemicals this invention, it is desirable to use the specific binding reaction of avidin and a biotin.

[0013] Moreover, in fixing an enzyme to a quartz resonator or a surface acoustic wave device in enforcing

the quantum approach of the amount of chemicals this invention, it is desirable to use the specific binding reaction of streptoavidin and a biotin.

[0014] Moreover, the quantum approach of the amount of chemicals this invention uses and is suitable to make an enzyme into an urease and carry out the quantum of the amount of ureas.

[0015] Moreover, according to the enzyme sensor of this invention, it is characterized by coming to fix an enzyme to a quartz resonator.

[0016] Moreover, according to the enzyme sensor of this invention, it is characterized by coming to fix an enzyme to a surface acoustic wave device.

[0017] Moreover, it is desirable to perform immobilization with an enzyme, a quartz resonator, or a surface acoustic wave device in operation of the enzyme sensor of this invention using the covalent bond of an enzyme and glutaraldehyde.

[0018] Moreover, it is desirable to use the specific binding reaction of avidin and a biotin for immobilization with an enzyme, a quartz resonator, or a surface acoustic wave device in operation of the enzyme sensor of this invention.

[0019] Moreover, it is desirable to use the specific binding reaction of streptoavidin and a biotin for immobilization with an enzyme, a quartz resonator, or a surface acoustic wave device in operation of the enzyme sensor of this invention.

[0020] Moreover, it is good to make an enzyme into an urease in operation of the enzyme sensor of this invention.

[0021] Moreover, in manufacturing the enzyme sensor of this invention, it is desirable to perform immobilization with an enzyme, a quartz resonator, or a surface acoustic wave device using the covalent bond of an enzyme and glutaraldehyde.

[0022] Moreover, in manufacturing the enzyme sensor of this invention, it is desirable to perform immobilization with an enzyme, a quartz resonator, or a surface acoustic wave device using the specific binding reaction of avidin and a biotin.

[0023] Moreover, in manufacturing the enzyme sensor of this invention, it is desirable to perform immobilization with an enzyme, a quartz resonator, or a surface acoustic wave device using the specific binding reaction of streptoavidin and a biotin.

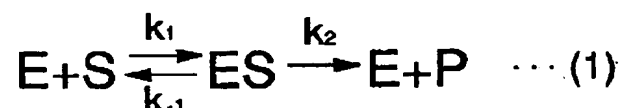
[0024] Moreover, in enforcing the manufacture approach for the enzyme sensor of this invention, it is good to make an enzyme into an urease.

[0025]

[Function] According to this invention, the quantum of the amount of a chemical (substrate) can be carried out by fixing an enzyme in vibrator and detecting change of the vibration frequency of this vibrator, without passing through a diffusion process.

[0026] The enzyme reaction which fixes an enzyme in vibrator and is shown in the following formula (1) and into which this enzyme disassembles a specific chemical (substrate) [0027]

[Formula 1]



[0028] (However, E, S, ES, and P are the enzymes, the chemicals (substrate), enzyme-substrate complexes,

and products of isolation respectively.) Moreover, k_1 , k_{-1} , and k_2 It is the rate constant of ES to the generation reaction of an ES complex, the dissociative reaction, and a product, respectively. Make an enzyme-substrate complex generate, this chemical is made to adhere to vibrator, and it is characterized by carrying out the quantum of the chemical from change of the vibration frequency of the vibrator by adhesion of this chemical. If the coating weight of the chemical to vibrator becomes constant value when the enzyme reaction shown in the above-mentioned formula (1) will be in a steady state, without passing through the immobilization which the product by the chemical and enzyme reaction which carry out a quantum diffuses according to this approach, the quantum of the amount of chemicals can be carried out from vibration frequency change of the vibrator in that time.

[0029] Moreover, since the covalent bond of an enzyme and a glutaraldehyde, the specific binding reaction of avidin and a biotin, or the specific binding reaction of streptavidin and a biotin is used [according to the manufacture approach of the enzyme sensor this invention] in fixing an enzyme to a quartz resonator, an enzyme is firmly combinable to a quartz resonator.

[0030]

[Example] Hereafter, with reference to a drawing, the example of the enzyme sensor used for it and its manufacture approach is collectively explained to the quantum approach list of the amount of chemicals of this invention. In addition, it does not pass over numerical conditions, such as the material of construction used in the following examples and its amount, the processing time, and processing temperature, for a suitable example, therefore this invention of be [it / what is limited to these conditions] is clear.

[0031] The 1st example of the 1st example explains the urea sensor using the quantum approach and this and its manufacture approach of the amount of ureas which comes to fix an urease to a quartz resonator as an enzyme as an example of the enzyme sensor which uses the quantum approach of the amount of chemicals this invention, and this, and its manufacture approach.

[0032] The so-called AT cut quartz resonator is suitable for the quartz resonator used in the 1st example. It is because the measurement error according to the difference in the temperature at the time of the quantum of the amount of chemicals since the frequency drift to 1. temperature change is small by using an AT cut quartz resonator is for being generated, and carries out things and 2. thickness slip vibration, so the advantage that the frequency drift to the amount coating weight of chemicals is remarkable is acquired.

[0033] Manufacture of a urea FET sensor (the 1)

(A) - (C) of drawing 1 is process drawing with which explanation of the urea sensor of the 1st example and its manufacture approach is presented. In each drawing, it is illustrating about one enzyme typically.

[0034] First, how to fix an urease 40 to the front face of a quartz resonator 30 as an enzyme through a GURATARU aldehyde is described.

[0035] First, a quartz resonator is processed by the silane coupling agent, and the amino group is formed in a front face. In this example, it is immersed in this 1 volume % water solution at a room temperature for 1 hour, using aminopropyl triethoxysilane (Chisso Corp. make) as a silane coupling agent. Then, a quartz resonator is washed by irradiating a 20kHz supersonic wave for 30 minutes in pure water, and excessive aminopropyl triethoxysilane is removed. Next, covalent bond is formed between aminopropyl triethoxysilane and the front face of a quartz resonator 30 by heat-treating a quartz resonator for 20 minutes under the temperature of 110 degrees C ((A) of drawing 1).

[0036] Next, covalent bond is formed between a glutaraldehyde and aminopropyl triethoxysilane by immersing this quartz resonator in the glutaraldehyde water solution of 1 volume % for 1 hour. Then, a quartz resonator 30 is washed by irradiating a 20kHz supersonic wave for 30 minutes in pure water, and an excessive glutaraldehyde is removed ((B) of drawing 1).

[0037] Next, a quartz resonator is immersed for 2 hours into a phosphate buffer solution with a pH [7.2] of 100ml which contains 1mg (product made from Funakoshi Pharmaceuticals) of ureases 40 for this quartz resonator 30. An urease 40 is fixed to a quartz resonator 30 through a glutaraldehyde in the meantime. An unreacted urease is removed by washing with the phosphate buffer solution of pH7.2 ((C) of drawing 1).

[0038] Manufacture of an urea sensor (the 2)

(A) - (C) of drawing 2 is process drawing with which explanation of the urea sensor of the 1st example and its manufacture approach is presented. In each drawing, it is illustrating about one enzyme typically.

[0039] Next, how to fix an urease 40 to the front face of a quartz resonator 30 as an enzyme through avidin and a biotin is described.

[0040] First, a quartz resonator 30 is processed by the silane coupling agent, and the amino group is formed in a front face. In this example, it is immersed in this 1 volume % water solution at a room temperature for 1 hour, using aminopropyl triethoxysilane (Chisso Corp. make) as a silane coupling agent. Then, a quartz resonator 30 is washed by irradiating a 20kHz supersonic wave for 30 minutes in pure water, and excessive aminopropyl triethoxysilane is removed. Next, covalent bond is formed between aminopropyl triethoxysilane and the front face of a quartz resonator 30 by heat-treating a quartz resonator 30 for 20 minutes under the temperature of 110 degrees C ((A) of drawing 1).

[0041] Next, in order to combine a biotin 34 with this quartz resonator 30, covalent bond is formed between the biotin long arm 36 and aminopropyl triethoxysilane by immersing this quartz resonator in the heavy carbonic acid buffer solution of pH8.0 containing the NHS-LC-biotin (trade name) (it is also called a biotin long arm the product made from Funakoshi Pharmaceuticals, and the following) 36 with a concentration of 0.1mg [/ml]. Then, a quartz resonator 10 is washed by irradiating a 20kHz supersonic wave for 30 minutes in pure water, and an excessive biotin long arm is removed ((B) of drawing 1).

[0042] Next, a quartz resonator 30 is immersed for 2 hours using the approach of Vernon (Vernon) indicated by reference III: "THE journal OBU cel biology (TheJournal of Cell Biology) Vol.93, pp.981-986 (1982)" into a phosphate buffer solution with a pH [containing 1mg of ureases 40 which combined avidin D(trade name) (product made from Funakoshi Pharmaceuticals) 38 as avidin 38 /7.2] of 100ml. A biotin 34 and avidin 38 carry out a specific binding reaction in the meantime. An unreacted urease is removed by washing with the phosphate buffer solution of pH7.2 ((C) of drawing 1).

[0043] Through the above process, the urease 40 was fixed to the front face of a quartz resonator 30, and the urea sensor was manufactured. In addition, the same effectiveness is acquired, even if the approach of immobilization of an urease 40 is not restricted to these and it uses the specific binding of streptoavidin and a biotin.

[0044] It measured as follows about the property of an urea sensor, next the response characteristic of the urea sensor which comes to fix an urease 40 to a quartz resonator 30 as an enzyme through a glutaraldehyde.

[0045] Drawing 3 is the block diagram having shown the system used for measurement of the response characteristic of the urea sensor of the 1st example. The terminal 44 of the quartz resonator 30 which

fixed the urease of an urea sensor 42 is connected with the oscillator circuit 46. The oscillator circuit 46 is connected with the generator (power source) 48. Moreover, the outgoing end of 46 of an oscillator circuit is connected also with the frequency counter 50, and this frequency counter 50 is connected with the computer 52. It is immersed in distilled water 56 in a beaker 54 by the urea sensor 42.

[0046] In the condition that this urea sensor 42 was immersed in the phosphate buffer solution 56 of pH7.2, it is specified quantity ***** about a urea to this phosphate buffer solution. And after adding a urea into a phosphate buffer solution, the oscillation frequency (vibration frequency) of the quartz resonator after 5-minute progress is measured. And it asked for the vibration frequency change by reducing the vibration frequency before adding a urea from this vibration frequency. It is because vibration frequency was fully stabilized as it is such elapsed time so that it might mention later having measured vibration frequency after the 5-minute progress which added the urea into the phosphate buffer solution.

[0047] Drawing 4 is the property Fig. of an urea sensor measured by the system of measurement mentioned above. The axis of abscissa of the graph of drawing 4 shows the amount of ureas (g/ml) applied to a phosphate buffer solution, and the axis of ordinate shows vibration frequency change (Hz) of the vibrator of an urea sensor. The straight line I in a graph connects what plotted both. it turns out with the increment in the amount of ureas that the vibration frequency of vibrator decreases at a rate of about 1 law so that clearly from the graph of drawing 4 . Moreover, change of such vibration frequency was not seen at all to other amounts of chemicals, such as a glucose. Therefore, it turned out that property with the urea sensor of this example sufficient as an urea sensor is acquired.

[0048] Next, the graph of the measurement result of aging of the output signal at the time of the urea sensor of the 1st example and the urea sensor of the example of a comparison being immersed in the phosphate buffer solution containing the ten to 3 g/ml amount of ureas at drawing 5 , respectively is shown. The axis of abscissa of a graph shows the elapsed time (minute) from measurement initiation, and as an output signal, an axis of ordinate sets variation of an oscillation frequency and output potential to 100, and shows the variation in each saturation state for it by the relative value. The curve II in a graph shows aging of the oscillation frequency of the urea sensor of the 1st example, and the curve III in a graph shows aging of the output voltage of the urea sensor explained in the conventional example as an example of a comparison. In the urea sensor of the 1st example, the variation of a frequency reached the saturation value mostly within 1 minute to having required for the urea sensor of the example of a comparison for about 20 minutes that the variation of output voltage reaches a saturation value so that clearly from the graph of drawing 5 . Thus, the urea sensor which is an example of the enzyme sensor using the quantum approach of the amount of chemicals this invention and it showed that the quantum of the amount of the amount of chemicals could be carried out in a short time.

[0049] Moreover, the variation of a frequency reached the saturation value mostly within 1 minute similarly [in the urea sensor which fixed and manufactured the urease using the specific binding of streptavidin and a biotin / that a glutaraldehyde was used].

[0050] The 2nd example of the 2nd example explains the urea sensor using the quantum approach and this and its manufacture approach of the amount of ureas which comes to fix an urease to a surface acoustic wave device as an enzyme as an example of the enzyme sensor which uses the quantum approach of the amount of chemicals this invention, and this, and its manufacture approach.

[0051] In the 2nd example of manufacture of an urea sensor, an urease is combined with a surface

acoustic wave device instead of a quartz resonator using the same approach as the 1st example.

[0052] It measured as follows about the response characteristic of an urea sensor, next the response characteristic of the urea sensor 60 which combined the urease 40 with the surface acoustic wave device 70 through the glutaraldehyde.

[0053] Drawing 6 is the block diagram having shown the system used for measurement of the response characteristic of the urea sensor of the 2nd example. This urea sensor 60 is connected with amplifier 62 and 64. A frequency counter (not shown) is connected between amplifier 62 and 64, and an oscillation frequency is measured. It is immersed by the urea sensor 60 into the phosphate buffer solution 68 of pH7.2 in a tank 66. In the 2nd example, the urease 40 is combined using what formed 1st and 2nd tolan DEYUSA 74 and 76 on ST cut quartz plate 72 as a surface acoustic wave device 70 on these tolan DEYUSA 74 and the quartz plate 72 between 76.

[0054] It is specified quantity ***** about a urea in this phosphate buffer solution 68 in the condition that the urea sensor 60 was immersed in the phosphate buffer solution 68 in this example. And after adding a urea into a phosphate buffer solution, the oscillation frequency of the urea sensor after 5-minute progress is measured. It is because the oscillation frequency of a surface acoustic wave device was fully stabilized [that such elapsed time measured the oscillation frequency after 5 minute progress after adding a urea into a solution, and].

[0055] Next, the measurement result of the response characteristic of an urea sensor is shown in drawing 7. The axis of abscissa of the graph of drawing 7 shows the urea concentration in a solution (g/ml), and the axis of ordinate shows oscillation frequency (it is also hereafter called vibration frequency) change (kHz) of an urea sensor. The straight line IV in a graph connects the plot of the vibration frequency change in each measurement urea concentration of the urea sensor of this example manufactured by the approach mentioned above. It turns out with the increment in the amount of ureas that vibration frequency decreases at a fixed rate so that clearly from the graph of drawing 7. Moreover, this urea sensor did not have a response in an oscillation frequency to the amounts of chemicals other than ureas, such as a glucose. Therefore, it has been checked that property sufficient as an urea sensor in this example had been acquired.

[0056] Next, the measurement result of aging of the output signal at the time of the urea sensor of the 2nd example and the urea sensor of the example of a comparison being immersed in the phosphate buffer solution containing the ten to 3 g/ml amount of ureas at drawing 8, respectively is shown. The axis of abscissa of a graph shows the elapsed time (minute) from measurement initiation, and an axis of ordinate sets variation of an oscillation frequency and output potential to 100, and shows the variation in each saturation state for it by the relative value. The curve V in a graph shows aging of the oscillation frequency of the urea sensor of the 2nd example, and the curve III in a graph shows aging of the output voltage of the urea sensor explained in the conventional example as an example of a comparison. In the urea sensor of the 2nd example, the variation of an oscillation frequency reached the saturation value mostly within 1 minute to having required for the urea sensor of the example of a comparison for about 20 minutes that the variation of output voltage reaches a saturation value so that clearly from the graph of drawing 5. Thus, it has checked that the quantum of the amount of the amount of chemicals could be carried out in a short time by the urea sensor which is an example of the enzyme sensor using the quantum approach of the amount of chemicals this invention, and it.

[0057] Moreover, the variation of an oscillation frequency reached the saturation value mostly within 1

minute similarly [in the urea sensor which fixed and manufactured the urease using the specific binding of streptoavidin and a biotin / that a glutaraldehyde was used].

[0058] Moreover, although the oscillation frequency of a surface acoustic wave device was measured as an output signal of an urea sensor in the 2nd example mentioned above, the resonance frequency of a surface acoustic wave device may be measured in this invention.

[0059]

[Effect of the Invention] According to this invention, fix an enzyme to vibrator, an enzyme-substrate complex is made to adhere to vibrator by the enzyme reaction, and change of the vibration frequency of this vibrator according to this coating weight is detected. For this reason, if the coating weight of the amount of chemicals to vibrator becomes constant value when an enzyme reaction will be in a steady state, without passing through the process which the product by the amount of chemicals and enzyme reaction which carry out a quantum diffuses, the quantum of the amount of chemicals can be carried out from vibration frequency change of the vibrator in that time. Consequently, as compared with the quantum approach of the conventional amount of chemicals, a quantum can be carried out by short time amount.

[0060] Moreover, since the covalent bond of an enzyme and a glutaraldehyde, the specific binding reaction of avidin and a biotin, or the specific binding reaction of streptoavidin and a biotin is used [according to the manufacture approach of the enzyme sensor this invention] in fixing an enzyme to a quartz resonator, an enzyme is firmly combinable to a quartz resonator.

[0061] Moreover, this invention uses and is suitable for the quantum of for example, the amount of ureas.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.**** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] (A) - (C) is process drawing with which explanation of the urea sensor of the 1st example and its manufacture approach is presented.

[Drawing 2] (A) - (C) is process drawing with which explanation of the urea sensor of the 2nd example and its manufacture approach is presented.

[Drawing 3] It is the block diagram having shown the system used for measurement of the response characteristic of the urea sensor of the 1st example.

[Drawing 4] It is the graph which shows the measurement result of the response characteristic of the urea sensor of the 1st example.

[Drawing 5] It is the graph which shows the measurement result of aging of the output signal of the urea sensor of the 1st example, and the urea sensor of the example of a comparison.

[Drawing 6] It is the block diagram having shown the system used for measurement of the response characteristic of the urea sensor of the 2nd example.

[Drawing 7] It is the graph which shows the measurement result of the response characteristic of the urea sensor of the 2nd example.

[Drawing 8] It is the graph which shows the measurement result of aging of the output signal of the urea sensor of the 2nd example, and the urea sensor of the example of a comparison.

[Drawing 9] It is the sectional view with which explanation of the conventional urea sensor is presented.

[Description of Notations]

12: Porous glass film 14: Urease

24: Silver-silver chloride electrode

26: Ammonia permselective membrane

28: Urea 30: Quartz resonator

34: Biotin

36: Biotin long arm 38: Avidin

40: Urease

42: Urea FET sensor 44: Terminal

46: Oscillator circuit 48: Generator

50: Frequency counter 52: Computer

54: Beaker 56: Phosphate buffer solution

60: Urea sensor 62: Amplifier

64: Amplifier 66: Tank

68: Phosphate buffer solution

70: Surface acoustic wave device 72: Quartz plate

74: Transducer

76: Transducer

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-43284

(43) 公開日 平成7年(1995)2月14日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 5/02	A	6928-2 J		
C 1 2 Q 1/00	Z	6807-4 B		
1/58		6807-4 B		
G 0 1 N 33/62	A	7055-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平5-190584

(22) 出願日 平成5年(1993)7月30日

(71) 出願人 000000295
沖電気工業株式会社
東京都港区虎ノ門1丁目7番12号
(72) 発明者 斎藤 稔
東京都港区虎ノ門1丁目7番12号 沖電気
工業株式会社内
(72) 発明者 海部 勝晶
東京都港区虎ノ門1丁目7番12号 沖電気
工業株式会社内
(72) 発明者 加藤 雅一
東京都港区虎ノ門1丁目7番12号 沖電気
工業株式会社内
(74) 代理人 弁理士 大垣 孝

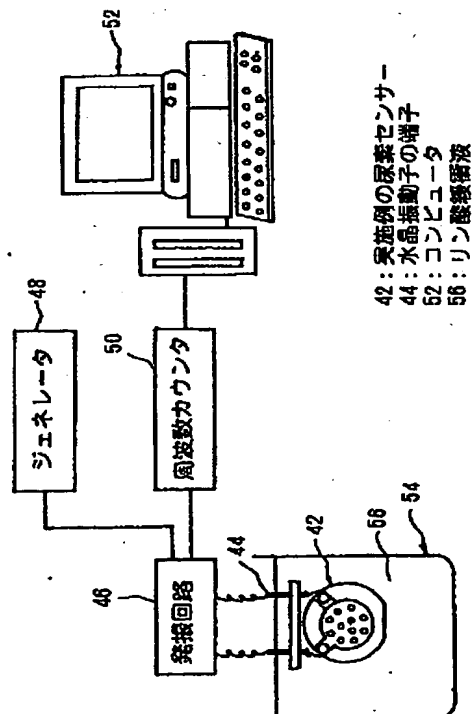
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学物質量の定量方法、これに用いる酵素センサーおよびその製造方法

(57) 【要約】

【目的】 化学物質量の量を短時間に定量することができる化学物質量の定量方法これに用いる酵素センサーおよびその製造方法の提供。

【構成】 尿素センサー42のウレアーゼを固定した水晶振動子30の端子44は、発振回路46と接続している。発振回路46は、ジェネレータ(電源)48と接続してある。また、発振回路の46の出力端は周波数カウンタ50とも接続してあり、この周波数カウンタ50はコンピュータ52と接続してある。尿素センサー42は、ピーカ54中のpH7.2のリン酸緩衝液56に浸漬してある。



第1実施例の尿素センサーの応答特性の測定系

(2)

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 水晶振動子に酵素を固定し、該酵素が特定の化学物質を分解する酵素反応により該化学物質を前記水晶振動子の表面に付着させた場合の発振周波数と、該化学物質が付着していない場合の前記水晶振動子の発振周波数とをそれぞれ比較することにより、化学物質を定量することを特徴とする化学物質の定量方法。

【請求項2】 表面弾性波素子に酵素を固定し、該酵素が特定の化学物質を分解する酵素反応により該化学物質を前記表面弾性波素子の表面に付着させた場合の発振周波数と、該化学物質が付着していない場合の前記表面弾性波素子の発振周波数とを比較するか、または、該化学物質が前記表面弾性波素子の表面に付着させた場合の共振周波数と、該化学物質が付着していない場合の前記表面弾性波素子の共振周波数とを比較することにより、化学物質を定量することを特徴とする化学物質の定量方法。

【請求項3】 請求項1または2に記載の化学物質の定量方法において、前記酵素を前記水晶振動子または前記表面弾性波素子に固定するにあたり、前記酵素とグルタルアルデヒドとの共有結合を利用することを特徴とする化学物質の定量方法。

【請求項4】 請求項1または2に記載の化学物質の定量方法において、前記酵素を前記水晶振動子または前記表面弾性波素子に固定するにあたり、アビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用することを特徴とする化学物質の定量方法。

【請求項5】 請求項1または2に記載の化学物質の定量方法において、前記酵素を前記水晶振動子または前記表面弾性波素子に固定するにあたり、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用することを特徴とする化学物質の定量方法。

【請求項6】 請求項1または2に記載の化学物質の定量方法において、前記酵素をウレアーゼとし、尿素量を定量することを特徴とする化学物質の定量方法。

【請求項7】 水晶振動子に酵素を固定してなることを特徴とする酵素センサー。

【請求項8】 表面弾性波素子に酵素を固定してなることを特徴とする酵素センサ。

【請求項9】 請求項7または8に記載の酵素センサーにおいて、前記酵素と前記水晶振動子または前記表面弾性波素子との固定を、前記酵素とグルタルアルデヒドとの共有結合を利用して行うことを特徴とする酵素センサー。

【請求項10】 請求項7または8に記載の酵素センサ

2

ーにおいて、

前記酵素と前記水晶振動子または前記表面弾性波素子との固定を、アビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用して行うことを特徴とする酵素センサー。

【請求項11】 請求項7または8に記載の酵素センサーにおいて、

前記酵素と前記水晶振動子または前記表面弾性波素子との固定を、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用することを特徴とする酵素センサー。

10 【請求項12】 請求項7または8に記載の酵素センサーにおいて、前記酵素をウレアーゼとすることを特徴とする酵素センサー。

【請求項13】 請求項7または8に記載の酵素センサーを製造するにあたり、

前記酵素と前記水晶振動子または前記表面弾性波素子との固定を、前記酵素とグルタルアルデヒドとの共有結合を利用して行うことを特徴とする酵素センサーの製造方法。

20 【請求項14】 請求項7または8に記載の酵素センサーを製造するにあたり、

前記酵素と前記水晶振動子または前記表面弾性波素子との固定を、アビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用して行うことを特徴とする酵素センサーの製造方法。

【請求項15】 請求項7または8に記載の酵素センサーを製造するにあたり、

前記酵素と前記水晶振動子または前記表面弾性波素子との固定を、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用して行うことを特徴とする酵素センサーの製造方法。

30 【請求項16】 請求項13、14または15に記載の酵素センサーの製造方法において、

前記酵素をウレアーゼとすることを特徴とする酵素センサーの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、化学物質の定量方法、これを用いる酵素センサーおよびその製造方法に関する。

40 【0002】

【従来の技術】近年、医療分野において、有機物質を選択的に定量する化学センサーが要望されている。例えば、臨床検査において、患者の血精および体液中の尿素の定量分析は腎機能を診断する上で重要である。また、慢性腎不全の患者に人工透析を行う際に、人工透析の回数および透析時間の目安を与え、計画的な人工透析を行う上でも尿素の定量分析は不可欠である。

【0003】これまで、例えば、文献1：「バイオセンサー、鈴木周一編、講談社サイエンティフィック刊（1984年）」によれば、化学センサーの認識機能部に酵

50

(3)

3

素の優れた分子認識機能を利用する試みがなされている。酵素が特定の化学物質質量（以下、基質とも称する）を認識しその化学物質質量に特異的な反応を触媒することによって増減する物質を酸素電極、過酸化水素電極、水素電極、アンモニア電極、二酸化炭素電極、イオン選択性FET電極等で電気信号に変換して定量する酵素センサーが提案されている。

【0004】従来の酵素センサーの一例として、図面を参照して、尿素センサーについて簡単に説明する。図9は、従来の尿素センサーの説明に供する断面図である。この尿素センサーは、多孔質ガラス膜12に固定されたウレアーゼ28によって尿素から分解生成した NH_4^+ を、アンモニア選択透過膜26を介して銀-塩化銀電極24で電気信号に変換して定量している。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、例えば、上述した尿素センサーでは、先ず、基質（この場合は尿素）が酵素固定化膜内に拡散し、そこでの酵素反応による生成物（ NH_4^+ ）がさらに、その生成物を選択的に透過する膜（アンモニア選択透過膜）を拡散した後20に電極（銀-塩化銀電極）に到達する構造であった。このため、測定を開始してから尿素センサーから出力される電気信号が一定値になるまで時間を要するという欠点があった。

【0006】このため、この出願に係る発明者は種々の検討を重ねた結果、水晶振動子の発振周波数、または、表面弾性波素子の発振周波数若しくは共振周波数が、これら水晶振動子または表面弾性波素子に付着する物質の質量に比例して減少することに着目した。（以下、水晶振動子および表面弾性波素子を併せて振動子と称する。また、発振周波数および共振周波数を併せて振動数と称する。）このような現象は、例えば、文献I：「生物物理、vol. 28, No. 6 (1988)」に記載されている。文献Iによれば、二分子膜被覆水晶振動子を用いることにより、匂い物質および苦み物質のセンシングが可能なが示されている。

【0007】そこで、この発明者は、種々の実験および検討をさらに重ねた結果、振動子に酵素を固定し、この振動子の振動数の変化を検出することにより、拡散過程を経ずに基質の量を定量する方法を見出した。

【0008】この発明は、このような点に鑑みてなされたものであり、従って、この出願に係る第1の目的は、化学物質質量の量を短時間に定量することができる化学物質質量の定量方法を提供することにある。また、この出願に係る第2の目的は、第1の目的の化学物質質量の定量方法に用いる酵素センサーを提供することにある。また、この発明の第3の目的は、第2の目的の酵素センサーの製造方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】この目的の達成を図るた

4

め、この発明の化学物質質量の定量方法によれば、水晶振動子に酵素を固定し、この酵素が特定の化学物質質量を分解する酵素反応により化学物質質量を水晶振動子の表面に付着させた場合の発振周波数と、化学物質質量が付着していない場合の水晶振動子の発振周波数とをそれぞれ比較することにより、化学物質質量を定量することを特徴とする。

【0010】また、この発明の化学物質質量の定量方法によれば、表面弾性波素子に酵素を固定し、この酵素が特定の化学物質質量を分解する酵素反応により化学物質質量を表面弾性波素子の表面に付着させた場合の発振周波数と、化学物質質量が付着していない場合の表面弾性波素子の発振周波数とを比較するか、または、化学物質質量が前記表面弾性波素子の表面に付着させた場合の共振周波数と、化学物質質量が付着していない場合の表面弾性波素子の共振周波数とを比較することにより、化学物質質量を定量することを特徴とする。

【0011】また、この発明の化学物質質量の定量方法を実施するにあたり、酵素を水晶振動子または表面弾性波素子に固定するにあたり、酵素とグルタルアルデヒドとの共有結合を利用することが望ましい。

【0012】また、この発明の化学物質質量の定量方法を実施するにあたり、酵素を水晶振動子または表面弾性波素子に固定するにあたり、アビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用することが望ましい。

【0013】また、この発明の化学物質質量の定量方法を実施するにあたり、酵素を水晶振動子または表面弾性波素子に固定するにあたり、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用することが望ましい。

【0014】また、この発明の化学物質質量の定量方法は、酵素をウレアーゼとし、尿素量を定量するのに用いて好適である。

【0015】また、この発明の酵素センサーによれば、水晶振動子に酵素を固定してなることを特徴とする。

【0016】また、この発明の酵素センサーによれば、表面弾性波素子に酵素を固定してなることを特徴とする。

【0017】また、この発明の酵素センサーの実施にあたり、酵素と水晶振動子または表面弾性波素子との固定を、酵素とグルタルアルデヒドとの共有結合を利用して行うことが望ましい。

【0018】また、この発明の酵素センサーの実施にあたり、酵素と水晶振動子または表面弾性波素子との固定を、アビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用することが望ましい。

【0019】また、この発明の酵素センサーの実施にあたり、酵素と水晶振動子または表面弾性波素子との固定を、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用することが望ましい。

【0020】また、この発明の酵素センサーの実施にあ

50

(4)

5

たり、酵素をウレアーゼとすると良い。

【0021】また、この発明の酵素センサーを製造するにあたり、酵素と水晶振動子または表面弾性波素子との固定を、酵素とグルタルアルデヒドとの共有結合を利用して行うことが望ましい。

【0022】また、この発明の酵素センサーを製造するにあたり、酵素と水晶振動子または表面弾性波素子との固定を、アビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用して行うことが望ましい。

【0023】また、この発明の酵素センサーを製造するにあたり、酵素と水晶振動子または表面弾性波素子との固定を、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合反応を利用して行うことが望ましい。

【0024】また、この発明の酵素センサーを製造方法を実施するにあたり、酵素をウレアーゼとすると良い。

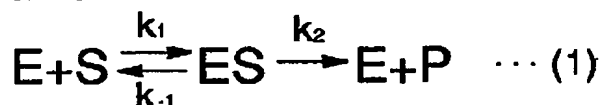
【0025】

【作用】この発明によれば、振動子に酵素を固定化し、この振動子の振動数の変化を検出することにより、拡散過程を経ずに化学物質（基質）の量を定量することができる。

【0026】振動子に酵素を固定化し、下記の式（1）に示す、この酵素が特定の化学物質（基質）を分解する酵素反応

【0027】

【化1】



【0028】（但し、E、S、ESおよびPは、それぞれ遊離の酵素、化学物質（基質）、酵素－基質複合体および生成物である。また、 k_1 、 k_{-1} および k_2 は、それぞれES複合体の生成反応と解離反応およびESから生成物の速度定数である。）により、酵素－基質複合体を生成させてこの化学物質を振動子に付着させ、この化学物質の付着による振動子の振動数の変化から化学物質を定量することを特徴とする。この方法によれば、定量する化学物質や酵素反応による生成物が拡散する固定を経ずに、上記式（1）に示す酵素反応が定常状態になることにより、振動子への化学物質の付着量が一定値になれば、その時点での振動子の振動数変化から化学物質量を定量することができる。

【0029】また、この発明の酵素センサーの製造方法によれば、水晶振動子へ酵素を固定するにあたり、酵素とグルタルアルデヒドとの共有結合、アビジンとビオチンとの特異的結合反応またはストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合反応を用いるので、酵素を水晶振動子へ強固に結合することができる。

【0030】

【実施例】以下、図面を参照して、この発明の化学物質

6

量の定量方法並びにそれに用いる酵素センサーおよびその製造方法の実施例について併せて説明する。尚、以下の実施例で用いる使用材料およびその量、処理時間、処理温度等の数値的条件は好適例にすぎず、従って、この発明は、これら条件に限定されるものでないことは明らかである。

【0031】第1実施例

第1実施例では、この発明の化学物質量の定量方法、これを用いる酵素センサーおよびその製造方法の一例として、水晶振動子に酵素としてウレアーゼを固定してなる、尿素量の定量方法、これを用いる尿素センサーおよびその製造方法について説明する。

【0032】第1実施例で用いる水晶振動子は、いわゆるATカット水晶振動子が好適である。ATカット水晶振動子を用いることによって、

1. 温度変化に対する周波数変動が小さいため、化学物質量の定量時の温度の違いによる測定誤差が生じにくいこと、
2. 厚み滑り振動をするため、化学物質量付着量に対する周波数変動が顕著であること、といった利点が得られるからである。

【0033】尿素FETセンサの製造（その1）

図1の（A）～（C）は、第1実施例の尿素センサーおよびその製造方法の説明に供する工程図である。各図では、模式的に1つの酵素について図示している。

【0034】まず、水晶振動子30の表面にグラタールアルデヒドを介して酵素としてウレアーゼ40を固定する方法について述べる。

【0035】まず、水晶振動子をシランカップリング剤で処理して表面にアミノ基を形成する。この実施例では、シランカップリング剤としてアミノプロピルトリエトキシシラン（チッソ社製）を用い、この1体積%水溶液に室温で1時間浸漬する。その後、水晶振動子を、純水中で20kHzの超音波を30分間照射することによって洗浄し、余分なアミノプロピルトリエトキシシランを除去する。次に、水晶振動子を110℃の温度下で20分間加熱処理することによってアミノプロピルトリエトキシシランと水晶振動子30の表面との間に共有結合を形成する（図1の（A））。

【0036】次に、この水晶振動子を1体積%のグルタールアルデヒド水溶液に1時間浸漬することにより、グルタールアルデヒドとアミノプロピルトリエトキシシランとの間に共有結合を形成する。その後、水晶振動子30を純水中で20kHzの超音波を30分間照射することによって洗浄し、余分なグルタールアルデヒドを除去する（図1の（B））。

【0037】次に、この水晶振動子30をウレアーゼ（フナコシ製薬製）40を1mg含む100mlのpH7.2のリン酸緩衝液中に水晶振動子を2時間浸漬する。この間にウレアーゼ40がグルタールアルデヒドを

(5)

介して水晶振動子30に固定される。未反応のウレアーゼは、pH7.2のリン酸緩衝液で洗浄することにより除去する(図1の(C))。

【0038】尿素センサーの製造(その2)

図2の(A)~(C)は、第1実施例の尿素センサーおよびその製造方法の説明に供する工程図である。各図では、模式的に1つの酵素について図示している。

【0039】次に、水晶振動子30の表面にアビジンおよびビオチンを介して酵素としてウレアーゼ40を固定する方法について述べる。

【0040】まず、水晶振動子30をシランカップリング剤で処理して表面にアミノ基を形成する。この実施例では、シランカップリング剤としてアミノプロピルトリエトキシシラン(チッソ社製)を用い、この1体積%水溶液に室温で1時間浸漬する。その後、水晶振動子30を、純水中で20kHzの超音波を30分間照射することによって洗浄し、余分なアミノプロピルトリエトキシシランを除去する。次に、水晶振動子30を110℃の温度下で20分間加熱処理することによってアミノプロピルトリエトキシシランと水晶振動子30の表面との間に共有結合を形成する(図1の(A))。

【0041】次に、この水晶振動子30にビオチン34を結合させるために、この水晶振動子を0.1mg/mlの濃度のNHS-LC-ビオチン(商品名)フナコシ製薬製、以下、ビオチンロングアームとも称する)36を含むpH8.0の重炭酸緩衝液に浸漬することにより、ビオチンロングアーム36とアミノプロピルトリエトキシシランとの間に共有結合を形成する。その後、水晶振動子10を純水中で20kHzの超音波を30分間照射することによって洗浄し、余分なビオチンロングアームを除去する(図1の(B))。

【0042】次に、文献III:「ザ・ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー(The Journal of Cell Biology) Vol. 93, pp. 981-986 (1982)」に記載されているヴァーノン(Vernon)の方法を用いて、アビジン38としてアビジンD(商品名)フナコシ製薬製)38を結合させたウレアーゼ40を1mg含む100mlのpH7.2のリン酸緩衝液中に水晶振動子30を2時間浸漬する。この間にビオチン34とアビジン38とが特異的結合反応をする。未反応のウレアーゼは、pH7.2のリン酸緩衝液で洗浄することにより除去する(図1の(C))。

【0043】以上の工程を経て、水晶振動子30の表面にウレアーゼ40を固定して、尿素センサーを製造した。尚、ウレアーゼ40の固定化の方法は、これらに限られるものではなく、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合を用いても、同様な効果が得られる。

【0044】尿素センサーの特性

次に、グルタルアルデヒドを介して水晶振動子30に

8

酵素としてウレアーゼ40を固定してなる尿素センサーの応答特性について以下のように測定した。

【0045】図3は、第1実施例の尿素センサーの応答特性の測定に用いた系を示したブロック図である。尿素センサー42のウレアーゼを固定した水晶振動子30の端子44は、発振回路46と接続している。発振回路46は、ジェネレータ(電源)48と接続してある。また、発振回路の46の出力端は周波数カウンタ50とも接続しており、この周波数カウンタ50はコンピュータ52と接続してある。尿素センサー42は、ピーカ54中の蒸留水56に浸漬してある。

【0046】この尿素センサー42をpH7.2のリン酸緩衝液56に浸漬した状態で、このリン酸緩衝液に尿素を所定量加える。そして、リン酸緩衝液中に尿素を加えた後5分経過後の水晶振動子の発振周波数(振動数)を測定する。そして、この振動数から尿素を加える前の振動数を減ずることによる振動数変化を求めた。リン酸緩衝液中に尿素を加えた5分経過後に振動数を測定したのは、後述するように、このような経過時間であると振動数が十分に安定したからである。

【0047】図4は、上述した測定系で測定した、尿素センサーの特性図である。図4のグラフの横軸は、リン酸緩衝液に加える尿素量(g/ml)を示し、縦軸は、尿素センサーの振動子の振動数変化(Hz)を示している。グラフ中の直線Iは、両者をプロットしたものを結んだものである。図4のグラフから明らかなように、尿素量の増加に伴い、振動子の振動数がほぼ一定の割合で減少していくことがわかる。また、このような振動数の変化は、グルコース等の他の化学物質量に対しては全く見られなかった。従って、この実施例の尿素センサーは、尿素センサーとして十分な特性が得られていることがわかった。

【0048】次に、図5に第1実施例の尿素センサーおよび比較例の尿素センサーを 10^{-3} g/mlの尿素量を含むリン酸緩衝液にそれぞれ浸漬した場合の出力信号の経時変化の測定結果のグラフを示す。グラフの横軸は、測定開始からの経過時間(分)を示し、縦軸は、出力信号として発振周波数および出力電位の変化量を、それぞれの飽和状態での変化量を100として相対値で示している。グラフ中の曲線IIは、第1実施例の尿素センサーの発振周波数の経時変化を示しており、グラフ中の曲線IIIは、比較例として、従来例で説明した尿素センサーの出力電圧の経時変化を示している。図5のグラフから明らかなように、比較例の尿素センサーでは、出力電圧の変化量が飽和値に達するのに約20分要したのに対し、第1実施例の尿素センサーでは、1分以内に周波数の変化量がほぼ飽和値に達した。このように、この発明の化学物質量の定量方法およびそれを用いた酵素センサーの一例である尿素センサーによって、化学物質量の量を短時間に定量することができることがわかった。

(6)

9

【0049】また、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合を利用してウレアーゼを固定して製造した尿素センサーの場合も、グルタルアルデヒドを用いた場合と同様に1分以内に周波数の変化量がほぼ飽和値に達した。

【0050】第2実施例

第2実施例では、この発明の化学物質量の定量方法、これを用いる酵素センサーおよびその製造方法の一例として、表面弾性波素子に酵素としてウレアーゼを固定してなる、尿素量の定量方法、これを用いる尿素センサーおよびその製造方法について説明する。

【0051】尿素センサーの製造

第2実施例においては、第1実施例と同一の方法を用いて、水晶振動子の代わりに表面弾性波素子にウレアーゼを結合させる。

【0052】尿素センサーの応答特性

次に、グルタルアルデヒドを介して表面弾性波素子70にウレアーゼ40を結合した尿素センサー60の応答特性について以下のように測定した。

【0053】図6は、第2実施例の尿素センサーの応答特性の測定に用いた系を示したブロック図である。この尿素センサー60は、増幅器62および64と接続してある。増幅器62および64間に周波数カウンタ（図示せず）を接続して発振周波数を測定する。尿素センサー60は水槽66中のpH7.2のリン酸緩衝液68中に浸漬してある。第2実施例では、表面弾性波素子70としてSTカット水晶板72上に第1および第2のトランデュース74および76を設けたものを用い、これらトランデュース74および76間の水晶板72上にウレアーゼ40を結合させている。

【0054】この実施例では、尿素センサー60をリン酸緩衝液68に浸漬した状態で、このリン酸緩衝液68中に尿素を所定量加える。そして、リン酸緩衝液中に尿素を加えた後5分経過後の尿素センサーの発振周波数を測定する。溶液中に尿素を加えた後5分経過後に発振周波数を測定したのは、このような経過時間であると表面弾性波素子の発振周波数が十分に安定したからである。

【0055】次に、図7に尿素センサーの応答特性の測定結果を示す。図7のグラフの横軸は溶液中の尿素濃度（g/ml）を示し、縦軸は尿素センサーの発振周波数（以下、振動数とも称する）変化（kHz）を示している。グラフ中の直線IVは、上述した方法で製造したこの実施例の尿素センサーの各測定尿素濃度における振動数変化のプロットを結んだものである。図7のグラフから明らかなように、尿素量の増加にともない、振動数が一定の割合で減少していくことがわかる。また、この尿素センサーは、グルコース等の尿素以外の化学物質量に対しては発振周波数に応答がなかった。従って、本実施例では尿素センサーとして十分な特性が得られたことが確認できた。

10

【0056】次に、図8に第2実施例の尿素センサーおよび比較例の尿素センサーを 10^{-3} g/mlの尿素量を含むリン酸緩衝液にそれぞれ浸漬した場合の出力信号の経時変化の測定結果を示す。グラフの横軸は、測定開始からの経過時間（分）を示し、縦軸は、発振周波数および出力電位の変化量を、それぞれの飽和状態での変化量を100として相対値で示している。グラフ中の曲線Vは、第2実施例の尿素センサーの発振周波数の経時変化を示しており、グラフ中の曲線IIIは、比較例として、従来例で説明した尿素センサーの出力電圧の経時変化を示している。図5のグラフから明らかなように、比較例の尿素センサーでは、出力電圧の変化量が飽和値に達するのに約20分要したのに対し、第2実施例の尿素センサーでは、1分以内に発振周波数の変化量がほぼ飽和値に達した。このように、この発明の化学物質量の定量方法およびこれを用いた酵素センサーの一例である尿素センサーによって、化学物質量の量を短時間に定量することができることが確認できた。

【0057】また、ストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合を利用してウレアーゼを固定して製造した尿素センサーの場合も、グルタルアルデヒドを用いた場合と同様に1分以内に発振周波数の変化量がほぼ飽和値に達した。

【0058】また、上述した第2実施例では、尿素センサーの出力信号として、表面弾性波素子の発振周波数を測定したが、この発明では表面弾性波素子の共振周波数を測定しても良い。

【0059】

【発明の効果】この発明によれば、振動子に酵素を固定し、酵素反応により酵素-基質複合体を振動子に付着させ、この付着量に応じたこの振動子の振動数の変化を検出する。このため、定量する化学物質量や酵素反応による生成物が拡散する過程を経ずに酵素反応が定常状態になることにより、振動子への化学物質量の付着量が一定値になれば、その時点での振動子の振動数変化から化学物質量を定量することができる。その結果、従来の化学物質量の定量方法と比較して短い時間で定量することができる。

【0060】また、この発明の酵素センサーの製造方法によれば、水晶振動子へ酵素を固定するにあたり、酵素とグルタルアルデヒドとの共有結合、アビジンとビオチンとの特異的結合反応またはストレプトアビジンとビオチンとの特異的結合反応を用いるので、酵素を水晶振動子へ強固に結合することができる。

【0061】また、この発明は、例えば尿素量の定量に用いて好適である。

【図面の簡単な説明】

【図1】（A）～（C）は、第1実施例の尿素センサーおよびその製造方法の説明に供する工程図である。

【図2】（A）～（C）は、第2実施例の尿素センサー

(7)

11

およびその製造方法の説明に供する工程図である。

【図3】第1実施例の尿素センサーの応答特性の測定に用いた系を示したブロック図である。

【図4】第1実施例の尿素センサーの応答特性の測定結果を示すグラフである。

【図5】第1実施例の尿素センサーおよび比較例の尿素センサーの出力信号の経時変化の測定結果を示すグラフである。

【図6】第2実施例の尿素センサーの応答特性の測定に用いた系を示したブロック図である。

【図7】第2実施例の尿素センサーの応答特性の測定結果を示すグラフである。

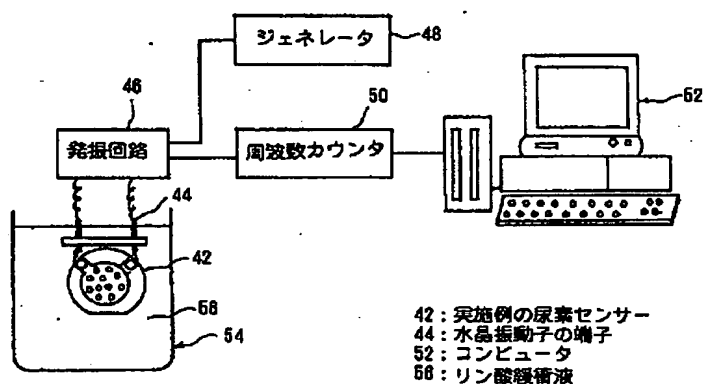
【図8】第2実施例の尿素センサーおよび比較例の尿素センサーの出力信号の経時変化の測定結果を示すグラフである。

【図9】従来の尿素センサーの説明に供する断面図である。

【符号の説明】

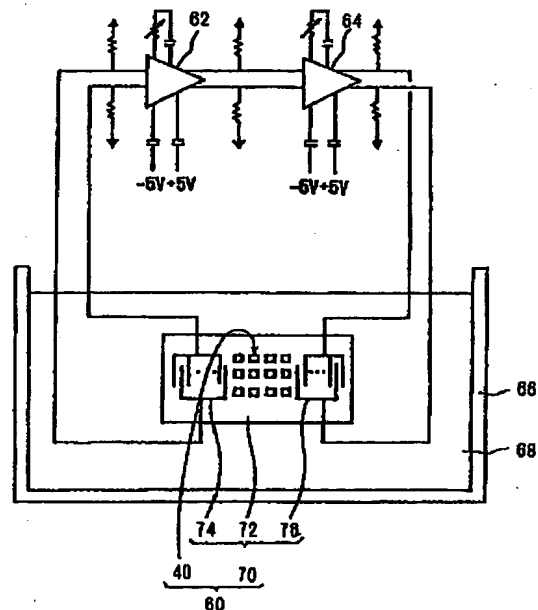
- | | |
|-----------------|-------------|
| 12 : 多孔質ガラス膜 | 14 : ウレアーゼ |
| 24 : 銀-塩化銀電極 | |
| 26 : アンモニア選択透過膜 | |
| 28 : 尿素 | 30 : 水晶振動子 |
| 34 : ビオチン | |
| 36 : ビオチンロングアーム | 38 : アビジン |
| 40 : ウレアーゼ | |
| 42 : 尿素FETセンサー | 44 : 端子 |
| 46 : 発振回路 | 48 : ジェネレータ |
| 50 : 周波数カウンタ | 52 : コンピュータ |
| 54 : ピーカ | 56 : リン酸緩衝液 |
| 60 : 尿素センサー | 62 : 増幅器 |
| 64 : 増幅器 | 66 : 水槽 |
| 68 : リン酸緩衝液 | |
| 70 : 表面弾性波素子 | 72 : 水晶板 |
| 74 : トランスデューサ | |
| 76 : トランスデューサ | |

【図3】



第1実施例の尿素センサーの応答特性の測定系

【図6】

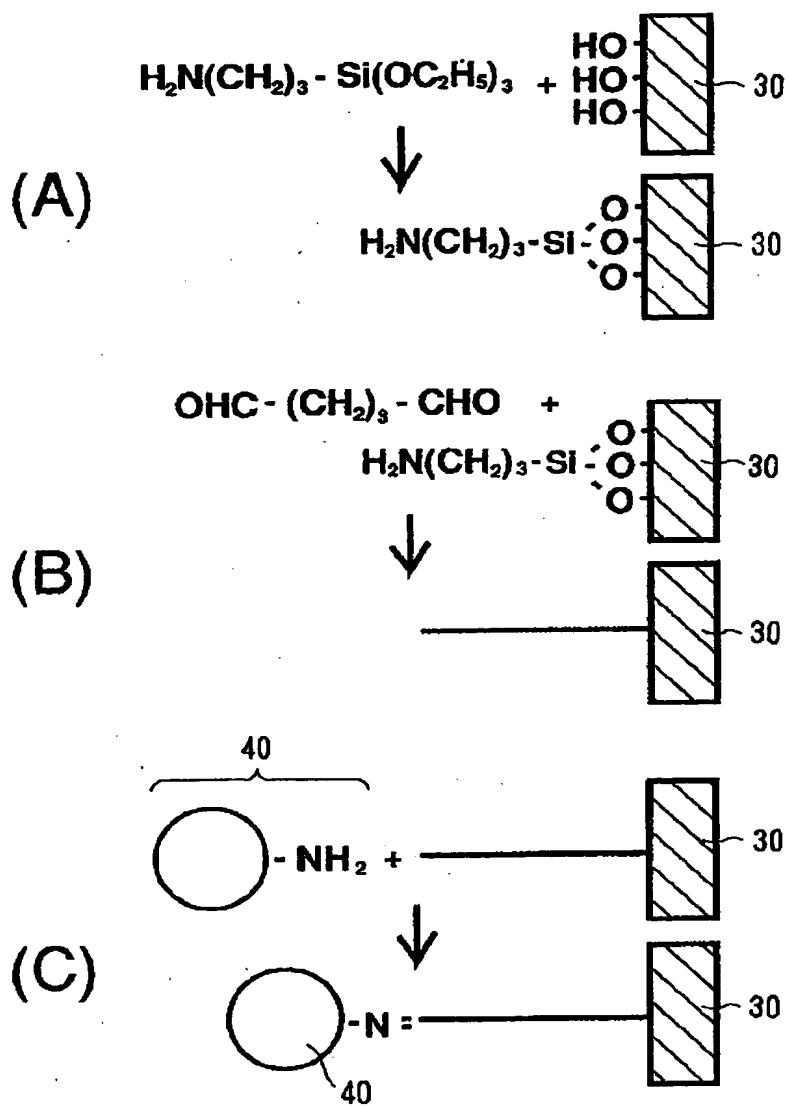


- | | |
|------------------|------------------|
| 40 : ウレアーゼ | 60 : 実施例の尿素センサ |
| 62, 64 : 増幅器 | 66 : 水槽 |
| 68 : リン酸緩衝液 | 70 : 表面弾性波素子 |
| 72 : STカットの水晶板 | 74 : 第1のトランスデューサ |
| 76 : 第2のトランスデューサ | |

第2実施例の尿素センサーの応答特性の測定系

(8)

【図1】

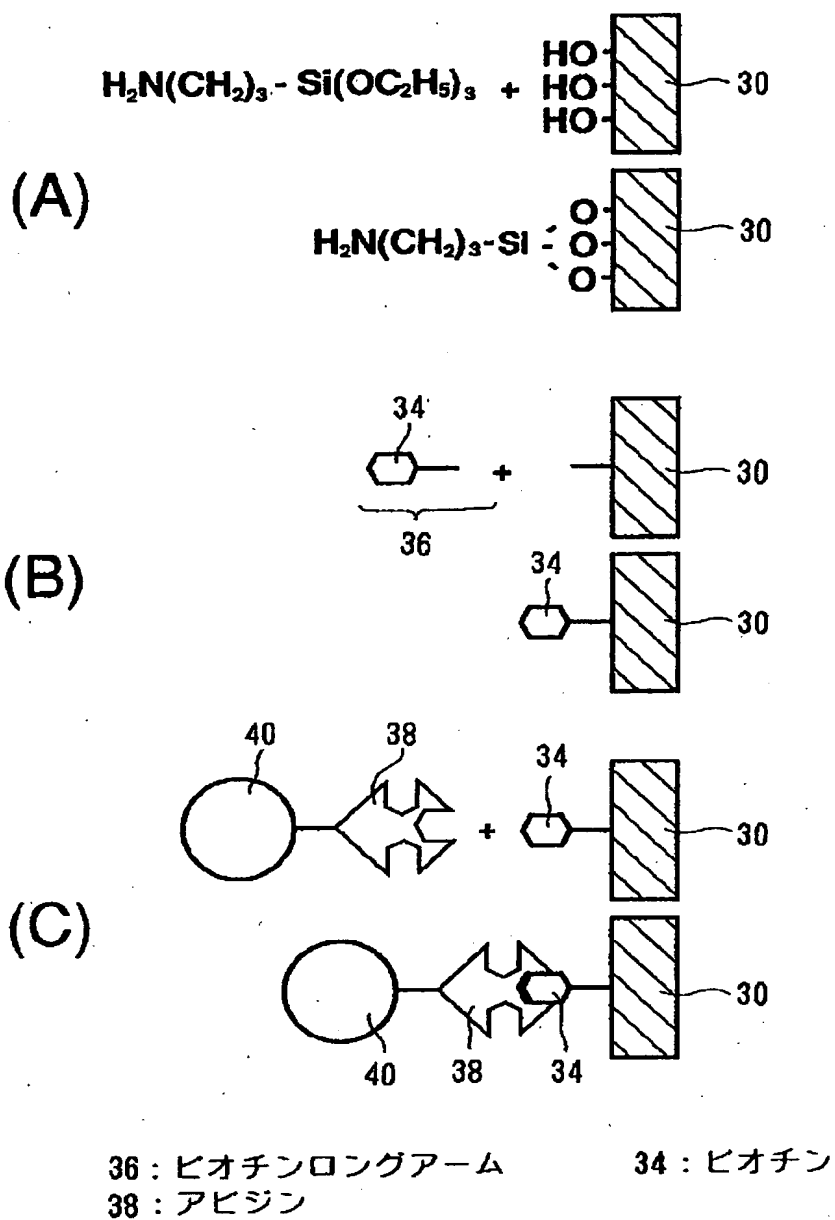


30 : 水晶振動子 40 : ウレアーゼ

第1実施例の尿素センサーの製造工程図

(9)

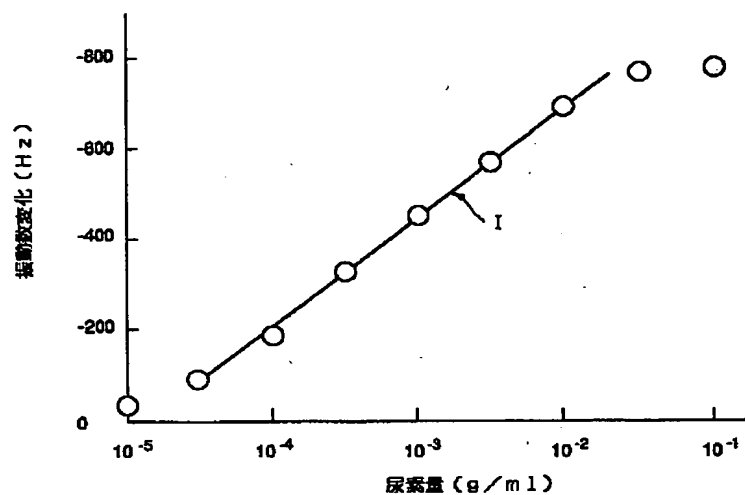
【図2】



第2実施例の尿素センサーの製造工程図

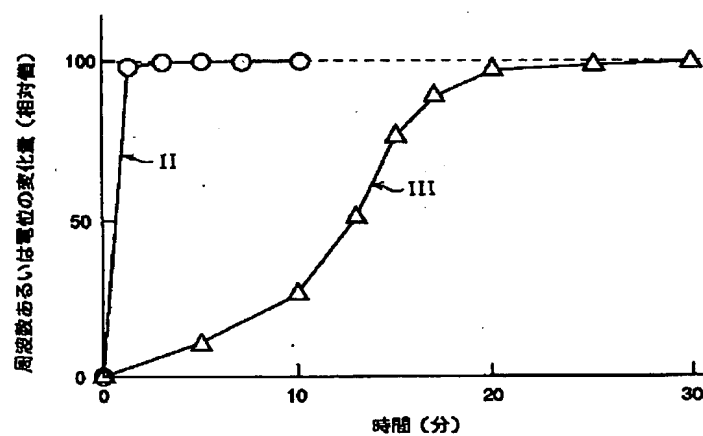
(10)

【図4】



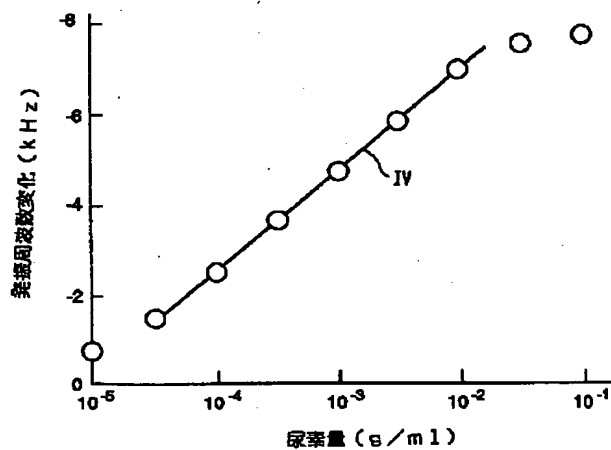
第1実施例の尿素センサーの応答特性図

【図5】



第1実施例の尿素センサーの出力信号の経時変化

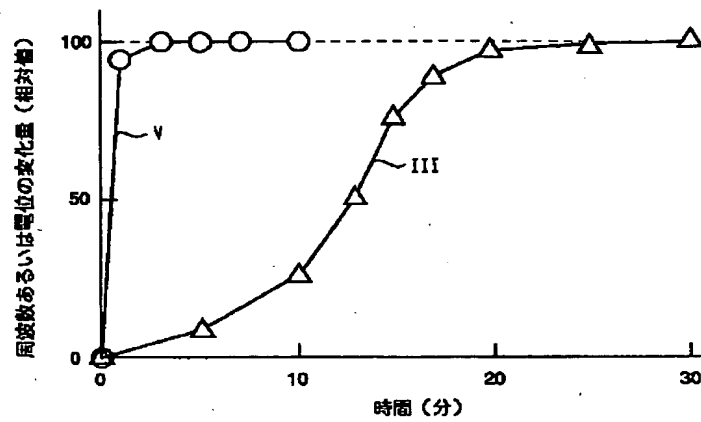
【図7】



第2実施例の尿素センサーの応答特性図

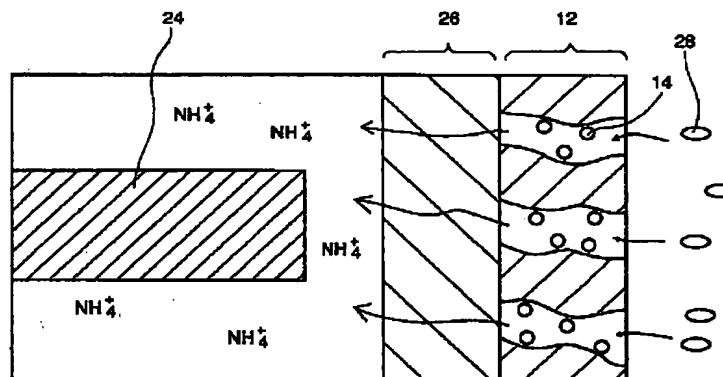
(11)

【図8】



第1実施例の尿素センサーの出力信号の経時変化

【図9】



12: 多孔質ガラス膜 24: 銀-塩化銀電極
 26: アンモニア選択透過膜 28: 尿素

従来の尿素センサーの構造

フロントページの続き

(72)発明者 宮本 裕生

東京都港区虎ノ門1丁目7番12号 沖電気
 工業株式会社内